

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

THIAGO JACOMASSO

O PAPEL DO GENE *RECK* COMO MARCADOR TUMORAL DE MELANOMA –  
FUNÇÃO E REGULAÇÃO DOS TRANSCRITOS *RECKB* E *RECKA*

CURITIBA  
2014

THIAGO JACOMASSO

O PAPEL DO GENE *RECK* COMO MARCADOR TUMORAL DE MELANOMA –  
FUNÇÃO E REGULAÇÃO DOS TRANSCRITOS *RECKB* E *RECKA*

Tese apresentada como requisito parcial à  
obtenção do título de Doutor em Bioquímica,  
no Curso de Pós-Graduação em Ciências –  
Bioquímica do Setor de Ciências Biológicas  
da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Profa. Dra. Sheila Maria  
Brochado Winnischofer

CURITIBA  
2014

Universidade Federal do Paraná  
Sistema de Bibliotecas

Jacomasso, Thiago

O papel do gene RECK como marcador tumoral de melanoma: função e regulação dos transcritos RECKB e RECKA. / Thiago Jacomasso. – Curitiba, 2014.

125f.: il. ; 30cm.

Orientadora: Sheila Maria Brochado Winnischofer

Tese (doutorado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

1. Genes. 2. Melanoma . 3. Metaloproteases. 4. Oncogenes. 5. Câncer.  
I. Título II. Winnischofer, Sheila Maria Brochado. III Universidade Federal do Paraná. Setor de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências - Bioquímica.

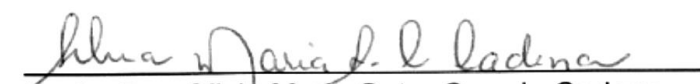
CDD (20. ed.) 574.192

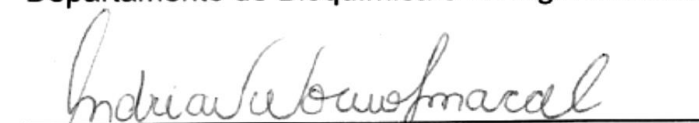
## TERMO DE APROVAÇÃO

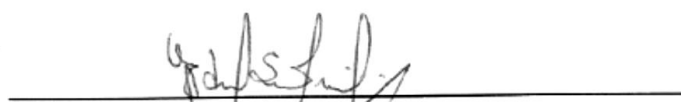
THIAGO JACOMASSO


### O PAPEL DO GENE *RECK* COMO MARCADOR TUMORAL DE MELANOMA – FUNÇÃO E REGULAÇÃO DOS TRANSCRITOS *RECKB* E *RECKA*

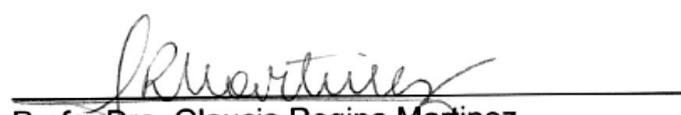
Tese aprovada como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor no Programa de Pós-Graduação em Ciências (Bioquímica), Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, pela seguinte banca examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Sílvia Maria Suter Correia Cadena  
Coordenadora PPG-Bioquímica  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Andréa Novaes Moreno Amaral  
Escola de Medicina, PUC-PR

  
\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Edvaldo da Silva Trindade  
Departamento de Biologia Celular, UFPR

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Giseli Klassen  
Departamento de Patologia Básica, UFPR

  
\_\_\_\_\_  
Profa. Dra. Glaucia Regina Martinez  
Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, UFPR

Curitiba, 28 de Março de 2014

## **AGRADECIMENTOS**

À minha orientadora, Profa. Dra. Sheila Maria Brochado Winnischofer;

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências – Bioquímica;

Aos membros da banca interna, Prof. Dr. Edvaldo Trindade e Profa. Dra. Glaucia Martinez, e também ao Prof. Dr. Wanderson da Rocha, pelas críticas construtivas e valiosos conselhos ao longo do desenvolvimento do projeto;

À Marina Trombetta-Lima, pelo inestimável suporte no desenvolvimento do projeto e pelo entusiasmo incessável e contagiante;

À Profa. Dra. Mari Cleide Sogayar, pela colaboração e suporte ao projeto;

Ao Núcleo de Fixação de Nitrogênio, pela disponibilização do termociclador para realização dos experimentos de PCR em tempo real.

Aos colegas, ex-colegas e professores do Laboratório de Oxidações Biológicas e dos demais laboratórios do Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular;

À minha família;

Ao CNPq e à Fundação Araucária, pela concessão da bolsa e financiamento do projeto.

## RESUMO

*RECK* (reversion-inducing cysteine rich protein with Kazal motifs) é descrito como um supressor tumoral, e a manutenção de níveis elevados correlaciona com um melhor prognóstico para pacientes portadores de diversos tipos de câncer. O papel de supressor tumoral é associado à inibição de metaloproteases de matriz extracelular (MMPs), envolvidas em processos como remodelamento da matriz, invasividade e angiogênese em tumores. Apesar do forte envolvimento de MMPs e de seus inibidores solúveis, TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteases*), no estabelecimento e na progressão de melanomas, o papel do gene *RECK* ainda é desconhecido neste tipo de tumor. Além disto, novos transcritos do gene *RECK*, resultantes de *splicing* alternativo foram recentemente identificados. Suas funções, porém, ainda não foram elucidadas. Neste trabalho analisamos dados de microarranjos de painéis de amostras clínicas de melanoma e demonstramos que o transcrito canônico do gene *RECK*, chamado *RECKA*, e *TIMP3* têm sua expressão silenciada durante a transformação do melanoma, enquanto *MT1MMP* e *TIMP2* são regulados positivamente. Também mostramos que amostras clínicas com expressão de *RECKA* acima da média apresentam menor expressão de *MT1MMP* e *TIMP2*, além de maior expressão de *TIMP3* que amostras com níveis de *RECKA* abaixo da média. Além disto, a superexpressão do transcrito alternativo do gene *RECK*, *RECKB*, na linhagem de melanoma metastático 1205Lu, promove o aumento da transcrição de *MMP9* e a ativação pró-MMP-9 *in vitro*, antagonizando *RECKA*. A superexpressão de *RECKB* promove, ainda, o aumento de expressão de *MT1MMP* e *TIMP2*, enquanto a expressão de *TIMP3* é reduzida, induzindo, assim, um perfil de expressão análogo ao observado em amostras clínicas com expressão de *RECKA* abaixo da média. Por fim, as células da linhagem 1205Lu foram incubadas com inibidores farmacológicos de diferentes vias de sinalização envolvidas na tumorigênese, para demonstrar que a razão *RECKB/RECKA* é regulada pelas vias de MAPK e PI3K. A análise da expressão de *RECKA*, de *RECKB* e de *RECKD* em dados de RNA-Seq depositados em bancos de dados de livre acesso revela que o proto-oncogene regulador de *splicing* alternativo SRSF1 altera a razão *RECKB/RECKA* sendo, portanto, um candidato à mediar a regulação desta razão pelas vias de sinalização oncogênicas testadas. Estes dados sugerem que *RECKB* e *RECKA* possuem papéis opostos em melanoma, o que implicaria em um papel dual para o gene *RECK*.

Palavras-chave: *Reversion-Inducing Cysteine-Rich Protein With Kazal Motifs*, Melanoma, Câncer, Expressão Gênica, Metaloproteases de Matriz, Inibidores Teciduais de Metaloproteases, *Splicing* Alternativo, Oncogenes

## ABSTRACT

*RECK* (reversion-inducing cysteine rich protein with Kazal motifs) is known as a tumor suppressor gene, and higher *RECK* levels correlate with a better prognosis for patients of several types of cancer. This tumor suppressor role is associated with the inhibition of matrix metalloproteinases, which are involved in processes like extracellular matrix degradation, cell invasiveness and tumor angiogenesis. Despite the wide implication of MMPs and their soluble inhibitors, TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases), in melanoma establishment and progression, the role of the *RECK* gene in this tumor type is yet to be studied. In addition, novel alternatively spliced transcripts of the *RECK* gene were recently identified, but their roles are still unknown. Here, we analyzed microarray datasets of clinical melanoma samples to demonstrate that the canonical *RECK* transcript, namely *RECKA*, and *TIMP3* are downregulated during the melanoma onset, whereas *MT1MMP* and *TIMP2* levels increase. We also show that clinical samples with above-average *RECKA* expression displayed lower *MT1MMP* and *TIMP2* and higher *TIMP3* levels than the group with below-average *RECKA* levels. Moreover, the overexpression of *RECKB*, a novel alternatively spliced transcript of the *RECK* gene, in the metastasis-derived cell line 1205Lu, upregulates *MMP9* transcription and enhances pro-MMP-9 activation *in vitro*, antagonizing *RECKA*, a MMP-9 inhibitor. Overexpressed *RECKB* also upregulates *MT1MMP* and *TIMP2* genes, and downregulates *TIMP3*, inducing an expression profile similar to that observed in low *RECKA* groups. We also incubated 1205Lu cells with pharmacological inhibitors of different signaling pathways associated with tumorigenesis to show that *RECKB/RECKA* ratio is regulated by MAPK and PI3K signaling. RNA-Seq analysis of *RECKA*, *RECKB* and *RECKD* expression reveals that the proto-oncogene splicing regulator SRSF1 increases *RECKB/RECKA* ratio. Thus, SRSF1 is a candidate mediator between oncogenic pathway signaling and the splicing ratio regulation observed. These data suggest that *RECKB* and *RECKA* possess opposite roles in the melanoma pathogenesis, implicating in dual roles for the *RECK* gene.

Keywords: Reversion-Inducing Cysteine-Rich Protein with Kazal Motifs, Melanoma, Cancer, Gene Expression, Matrix Metalloproteinases, Tissue Inhibitors of Metalloproteinases, Alternative Splicing, Oncogenes

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – INTERAÇÃO ENTRE QUERATINÓCITO E MELANÓCITO .....	22
FIGURA 2 – ETAPAS DA PROGRESSÃO DO MELANOMA.....	24
FIGURA 3 – DOMÍNIOS ESTRUTURAIS DAS METALOPROTEASES DE MATRIZ EXTRACELULAR .....	29
FIGURA 4 – PONTOS DE AÇÃO DE RECK SOBRE A ATIVIDADE DE MMPs .....	33
FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS TRANSCRITOS ALTERNATIVOS DE <i>RECK</i> .....	36
FIGURA 6 – DOMÍNIOS PREDITOS PARA OS PRODUTOS PROTEICOS DOS TRANSCRITOS ALTERNATIVOS DO GENE <i>RECK</i> .....	37
FIGURA 7 – FORMAS DE <i>SPLICING</i> ALTERNATIVO .....	39
FIGURA 8 – REGULAÇÃO DO <i>SPLICING</i> ALTERNATIVO.....	40
FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS VETORES UTILIZADOS PARA GERAÇÃO DAS LINHAGENS COM EXPRESSÃO MODIFICADA DE <i>RECKA</i> E <i>RECKB</i> .....	47
FIGURA 10 – ESQUEMA DO PROCEDIMENTO DE PRODUÇÃO DAS PARTÍCULAS LENTIVIRAIS E INFECÇÃO DAS CÉLULAS DE INTERESSE .....	49
FIGURA 11 – ESQUEMA DO ENSAIO DE DETERMINAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO LIVRE DE ADESÃO .....	58
FIGURA 12 – <i>HEATMAP</i> DA EXPRESSÃO DE MMPs E SEUS INIBIDORES EM AMOSTRAS DE TECIDOS NORMAIS, <i>NEVI</i> BENIGNOS E MELANOMA MALIGNO.....	62
FIGURA 13 – COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO DE SPEARMAN (“r”) ENTRE OS PERFIS DE EXPRESSÃO DE <i>RECKA</i> , <i>TIMP3</i> , <i>MT1MMP</i> E <i>TIMP2</i> .....	63
FIGURA 14 – MODULAÇÃO DOS NÍVEIS DE <i>RECKA</i> , <i>TIMP3</i> , <i>MT1MMP</i> E <i>TIMP2</i> NA TRANSFORMAÇÃO MALIGNA DO MELANÓCITO .....	64
FIGURA 15 – <i>HEATMAP</i> DA EXPRESSÃO DE MMPs E SEUS INIBIDORES EM AMOSTRAS DE MELANOMA PRIMÁRIO E MELANOMA METASTÁTICO .....	65
FIGURA 16 – COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO DE SPEARMAN (“r”) ENTRE OS PERFIS DE EXPRESSÃO DE <i>RECKA</i> , <i>TIMP3</i> , <i>MT1MMP</i> E <i>TIMP2</i> .....	66



FIGURA 17 – MODULAÇÃO DOS NÍVEIS DE <i>RECKA</i> , <i>TIMP3</i> , <i>MT1MMP</i> E <i>TIMP2</i> NA PROGRESSÃO DO MELANOMA PRIMÁRIO PARA A METÁSTASE.....	67
FIGURA 18 – DIFERENÇAS DOS PERFIS DE EXPRESSÃO DE <i>TIMP3</i> , <i>MT1MMP</i> E <i>TIMP2</i> ENTRE AMOSTRAS DE BAIXA E DE ALTA EXPRESSÃO RESIDUAL DE <i>RECKA</i> .....	68
FIGURA 19 – ORGANIZAÇÃO DO <i>LOCUS</i> DE <i>RECK</i> E POSIÇÃO DO ALINHAMENTO DOS shRNAs E <i>PRIMERS</i> UTILIZADOS NESTE ESTUDO.....	70
FIGURA 20 – QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS TRANSCRITOS DO GENE <i>RECK</i> EM CÉLULAS DA LINHAGEM 1205Lu TRANSDUZIDAS COM DIFERENTES shRNAs.....	71
FIGURA 21 – <i>WESTERN BLOTTING</i> PARA DETECÇÃO DE <i>RECKA</i> NA LINHAGEM 1205Lu TRANSDUZIDA COM shRECKB OU shRECKA .....	72
FIGURA 22 – FLUORESCÊNCIA DAS LINHAGENS DE MELANOMA TRANSDUZIDAS COM pLV-EGFP OU pLV-RECKB.....	73
FIGURA 23 – NÍVEIS DO mRNA <i>RECKB</i> NAS LINHAGENS CONTROLE OU COM SUPEREXPRESSÃO DE <i>RECKB<sup>orf</sup></i> .....	74
FIGURA 24 – CURVA DE PROLIFERAÇÃO DE LINHAGENS TRANSDUZIDAS COM shRECKA OU shRECKB.....	75
FIGURA 25 – CURVA DE PROLIFERAÇÃO DAS LINHAGENS TRANSDUZIDAS COM pLV-RECKB .....	75
FIGURA 26 – EXPRESSÃO DE <i>MMPs</i> E <i>TIMPs</i> EM CÉLULAS DA LINHAGEM 1205Lu TRANSDUZIDAS COM shRECKA OU shRECKB .....	77
FIGURA 27 – EXPRESSÃO DE <i>MMPs</i> E <i>TIMPs</i> E <i>RECKA</i> EM CÉLULAS DA LINHAGEM 1205Lu TRANSDUZIDAS COM <i>RECKB<sup>orf</sup></i> .....	78
FIGURA 28 – ZIMOGRAMAS DOS MEIOS CONDICIONADOS PELAS CÉLULAS COM EXPRESSÃO MODULADA DE <i>RECKA</i> OU <i>RECKB</i> NA PRESENÇA OU NA AUSÊNCIA DE MATRIGEL .....	80
FIGURA 29 – ZIMOGRAMAS DOS MEIOS CONDICIONADOS PELAS CÉLULAS COM EXPRESSÃO MODULADA DE <i>RECKA</i> OU <i>RECKB</i> NA PRESENÇA DE MATRIGEL.....	81

FIGURA 30 – ANÁLISE DA INVASÃO EM MATRIGEL® POR CÉLULAS COM SILENCIAMENTO DE <i>RECKA</i> OU <i>RECKB</i> .....	82
FIGURA 31 – ANÁLISE DA INVASÃO EM MATRIGEL® POR CÉLULAS QUE SUPEREXPRESSAM <i>RECKB<sup>orf</sup></i> .....	83
FIGURA 32 – CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS EM AGAROSE POR LINHAGENS DERIVADAS DE 1205Lu .....	84
FIGURA 33 – CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS EM AGAROSE POR LINHAGENS DERIVADAS DE WM35 .....	85
FIGURA 34 – MORFOLOGIA DAS CÉLULAS DA LINHAGEM 1205Lu APÓS INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DE VIAS DE TRANSDUÇÃO DE SINAIS ONCOGÊNICOS.....	86
FIGURA 35 – NÍVEIS DE mRNAs DE <i>RECKA</i> E <i>RECKB</i> NA LINHAGEM 1205Lu APÓS INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DE VIAS DE TRANSDUÇÃO DE SINAIS ONCOGÊNICOS.....	87
FIGURA 36 – NÍVEIS PROTEICOS DE <i>RECKA</i> E DA FORMA FOSFORILADA DE ERK1/2 APÓS TRATAMENTO COM INIBIDORES FARMACOLÓGICOS DE TRANSDUÇÃO DE SINAIS ONCOGÊNICOS. ....	88
FIGURA 37 – PREDIÇÃO DOS SÍTIOS DE LIGAÇÃO DE PROTEÍNAS SRSF NOS ÉXONS 9 DOS TRANSCRITOS <i>RECKA</i> E <i>RECKB</i> PELA FERRAMENTA ESE FINDER 3.0 .....	90
FIGURA 38 – MODULAÇÃO DOS NÍVEIS DE <i>SRSF1</i> NA TRANSFORMAÇÃO MALIGNA DO MELANÓCITO E NA PROGRESSÃO PARA A METÁSTASE .....	92
FIGURA 39 – EXPRESSÃO DE <i>MMP2</i> , <i>MMP9</i> E <i>TIMP1</i> EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE DIFERENTES ESTÁGIOS DA PROGRESSÃO .....	124
FIGURA 40 – EXPRESSÃO E CORRELAÇÃO ENTRE MMPs E INIBIDORES EM LINHAGENS DE MELANOMA HUMANO.....	125

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – SEQUÊNCIAS DOS shRNA A SEREM UTILIZADOS .....	46
TABELA 2 – PRODUÇÃO DAS PARTÍCULAS LENTIVIRAIS PARA SILENCIAMENTO DE <i>RECKA</i> OU <i>RECKB</i> .....	48
TABELA 3 – SEQUÊNCIAS E CONCENTRAÇÕES DOS PRIMERS UTILIZADOS NOS ENSAIOS DE qPCR.....	54
TABELA 4 – SONDAS CORRESPONDENTES A CADA GENE ANALISADO EM CONJUNTOS DE DADOS DE MICROARRANJOS.....	59
TABELA 5 – DOMÍNIOS PROTEICOS PREDITOS PARA A REGIÃO COMUM A <i>RECKA</i> E <i>RECKB</i> .....	69
TABELA 6 – EXPRESSÃO DOS TRANSCRITOS DO GENE <i>RECK</i> APÓS O SILENCIAMENTO DE <i>SRSF1</i> EM CÉLULAS HeLa .....	91
TABELA 7 – SÍTIOS DE LIGAÇÃO DE MICRO RNAs PRESENTES NO mRNA <i>RECKB</i> .....	93

## LISTA DE SIGLAS

ADP -	Adenosina difosfato
ANOVA -	Análise de Variância ( <i>Analysis of Variance</i> )
ARF -	Quadro de Leitura Alternativo ( <i>Alternate Reading Frame</i> )
ATP -	Adenosina trifosfato
BBP -	Proteína ligante do Ponto de Ramificação ( <i>Branch point Binding Protein</i> )
BLAST -	Ferramenta Básica de Alinhamento Local ( <i>Basic Local Alignment Search Tool</i> )
BLAT -	Ferramenta de alinhamento semelhante ao BLAST ( <i>BLAST-Like Alignment Tool</i> )
BSA -	Albumina Sérica Bovina ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
CDK -	Quinase Dependente de Ciclina ( <i>Cyclin-Dependent Kinase</i> )
cDNA -	DNA Complementar
CMV -	Citomegalovirus
C <sub>t</sub> -	Ciclo de equivalência ao valor de <i>threshold</i>
DMEM -	Meio Eagle modificado por Dulbecco ( <i>Dulbecco Modified Eagle Medium</i> )
DMSO -	Dimetilsulfóxido
DNA -	Ácido Desoxirribonucleico ( <i>Deoxyribonucleic Acid</i> )
ECL -	Quimioluminescência Aprimorada ( <i>Enhanced Chemiluminescence</i> )
EDTA -	Ácido Etilenodiaminotetracético
EGF -	Fator de Crescimento Epidermal ( <i>Epidermal Growth Factor</i> )
EGFP -	Proteína Fluorescente Verde Aprimorada ( <i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i> )
EGFR -	Receptor de Fator de Crescimento Epidermal ( <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> )
ERK -	Quinase regulada por sinais externos ( <i>External signal-Regulated Kinase</i> )
ESE -	Indutor exônico de <i>splicing</i> ( <i>Exonic Splicing Enhancer</i> )
ESS -	Silenciador exônico de <i>splicing</i> ( <i>Exonic Splicing Silencer</i> )

EST -	Marcas de sequências expressas ( <i>Expressed Sequence Tags</i> )
FACS -	Arranjo de Células Ativado por Fluorescência ( <i>Fluorescence-Activated Cell Sorting</i> )
FPKM -	Fragmentos Por Milhar De Bases De Transcrito Por Milhão De Bases Mapeadas
GAP -	Proteína Ativadora de GTPase ( <i>GTPase Activating Protein</i> )
GAPDH -	Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
GDP -	Guanosina difosfato
GEF -	Fator de Troca de Nucleotídeos de Guanina ( <i>Guanine Exchange Factor</i> )
GEO -	<i>Gene Expression Omnibus</i>
GPI -	Glicosilfosfatidilinositol
GTP -	Guanosina trifosfato
HMBS -	Hidroximetilbilano Sintase
HMG-CoA -	3-hidróxi-3-metilglutaril-coenzima A
HPRT -	Hipoxantina-prolina ribosil transferase
IgG -	Imunoglobulina G
INCA -	Instituto Nacional do Câncer
INK -	Inibidor de Quinase
ISE -	Indutor Intrônico de <i>Splicing</i> ( <i>Intronic Splicing Enhancer</i> )
ISS -	Silenciador Intrônico de <i>Splicing</i> ( <i>Intronic Splicing Silencer</i> )
L-15 -	Meio Leibowitz - 15
LTR -	Longas Sequências Terminais ( <i>Long Terminal Repeats</i> )
MAPK -	Proteína Quinases Ativadas por Mitógenos ( <i>Mitogen-Activated Protein Kinases</i> )
MEC -	Matriz Extracelular
MEK -	ERK Quinase Estimulada por Mitógenos ( <i>Mitogen-stimulated ERK kinase</i> )
miRNA -	Micro RNA
MMP -	Metaloprotease de Matriz Extracelular ( <i>Matrix Metalloproteinase</i> )
MOI -	Multiplicidade de Infecção ( <i>Multiplicity of Infection</i> )
mRNA -	RNA Mensageiro

MSH -	Hormônio Estimulador de Melanócitos ( <i>Melanocyte Stimulating Hormone</i> )
MT-MMP -	MMP do Tipo Ligado à Membrana ( <i>Membrane Type MMP</i> )
mTOR -	Alvo de Rapamicina em Mamíferos ( <i>Mammalian Target of Rapamycin</i> )
NCBI -	Centro Nacional (Americano) de Informação em Biotecnologia ( <i>National Center for Biotechnological Information</i> )
ORF -	Quadro Aberto de Leitura ( <i>Open Reading Frame</i> )
pA -	Sítio de Poliadenilação
PAGE -	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida ( <i>Polyacrylamide Gel Electrophoresis</i> )
PBSA -	Salina em Tampão Fosfato ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )
PCR -	Reação em Cadeia da Polimerase ( <i>Polimerase Chain Reaction</i> )
PDK -	Quinase Dependente de Fosfoinosítídeos ( <i>Phosphoinositide-Dependent Kinase</i> )
PGK -	Fosfoglicerato quinase
PH -	Homologo a <i>Plekstrina</i>
PI3K -	Fosfoinosítídeo-3-quinase
PIP <sub>2</sub> -	Fosfoinosítídeo-(4,5)-difosfato
PIP <sub>3</sub> -	Fosfoinosítídeo-(3,4,5)-difosfato
PKA -	Proteína Quinase A
PKB -	Proteína Quinase B
PKC -	Proteína Quinase C
POMC -	Pro-opiomelanocortina
Pré-mRNA -	Precursor de mRNA
PTEN -	Fosfatase Homóloga a Tensina
qPCR -	Reação em Cadeia, Quantitativa, da Polimerase
RECK -	Proteína Indutora de Reversão rica em cisteína com motivos Kazal ( <i>Reversion-inducing Cysteine-rich protein with Kazal motifs</i> )
RGP -	Perfil de Crescimento Radial ( <i>Radial Growth Profile</i> )
RNA -	Ácido Ribonucleico ( <i>Ribonucleic Acid</i> )
RNAi -	Interferência de RNA ( <i>RNA interference</i> )
RNA-Seq -	Sequenciamento de RNA
ROCK -	<i>Rho-activated coiled coil kinase</i>

RRE -	Elemento Responsivo a VER ( <i>Rev Responsive Element</i> )
RT -	Transcrição Reversa ( <i>Reverse Transcription</i> )
SDS -	Dodecil Sulfato de Sódio
shRNA -	<i>Short hairpin RNA</i>
snRNA -	Pequeno RNA nuclear
snRNP -	Ribonucleoproteínas Nucleares Pequenas
SPI -	Inibidor de Serina Protease ( <i>Serine Protease Inhibitor</i> )
SR -	Proteína Rica em Serina e Arginina
SRA -	<i>Sequence Read Archive</i>
SRPK -	Quinase Específica de Proteínas SR ( <i>SR-specific Protein Kinase</i> )
TBS -	Solução Salina em Tampão Tris-HCl ( <i>Tris Buffered Saline</i> )
TGF- $\beta$ -	Fator de Crescimento Tumoral – $\beta$ ( <i>Tumor Growth Factor – <math>\beta</math></i> )
TIMP -	Inibidor Tecidual de Metaloproteases ( <i>Tissue Inhibitor of Metalloproteinases</i> )
T <sub>m</sub> -	Temperatura de Dissociação de Duplas-Fitas
UI -	Unidades Infecciosas
UTR -	Região Não Traduzida ( <i>Untranslated Region</i> )
UV -	Ultravioleta
UVA -	Ultravioleta A
UVB -	Ultravioleta B
VEGF -	Fator de Crescimento Endotelial Vascular ( <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i> )
VGP -	Perfil de Crescimento Vertical ( <i>Vertical Growth Profile</i> )
WT -	Tipo Selvagem ( <i>Wild Type</i> )
ZP -	<i>Zona Pelucida</i>

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>18</b>
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA .....</b>	<b>20</b>
2.1 MELANOMA .....	20
2.1.1 Definição, Fatores de Risco, Prevalência e Morbidade .....	20
2.1.2 Patogênese e Progressão .....	20
2.1.3 Vias de Sinalização em Melanoma .....	25
2.1.3.1 Via das quinases ativadas por mitógenos (MAPK) .....	25
2.1.3.2 Fosfoinositídeo-3-quinase (PI3K) .....	27
2.2 METALOPROTEASES DE MATRIZ EXTRACELULAR .....	28
2.2.1 Definição e Estrutura .....	28
2.2.2 Funções e Regulação .....	29
2.2.3 Papel das Metaloproteases no Melanoma .....	31
2.3 RECK .....	32
2.3.1 Características Estruturais e Funções .....	32
2.3.2 Regulação Transcricional e Pós-Transcricional .....	35
2.3.3 Transcritos Alternativos de <i>RECK</i> .....	36
2.4 <i>SPLICING</i> ALTERNATIVO .....	38
<b>3 JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>42</b>
<b>4 OBJETIVOS .....</b>	<b>43</b>
4.1 OBJETIVO GERAL .....	43
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	43
<b>5 MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>44</b>
5.1 CULTIVO DE CÉLULAS .....	44
5.1.1 Obtenção das Linhagens Utilizadas .....	44
5.1.2 Manutenção e Preservação das Culturas .....	44
5.1.3 Incubação com Inibidores Farmacológicos de Vias de Sinalização .....	45
5.2 GERAÇÃO DAS LINHAGENS COM EXPRESSÃO MODIFICADA DOS TRANSCRITOS DO GENE <i>RECK</i> .....	45
5.2.1 Obtenção dos Plasmídeos .....	45
5.2.2 Produção das Partículas Lentivirais .....	47
5.2.3 Determinação do Título Viral do Meio Condicionado .....	49
5.2.4 Infecção das Células de Interesse .....	50
5.2.5 Seleção das Células Transduzidas e Obtenção das Linhagens Modificadas ..	50
5.3 QUANTIFICAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR .....	51
5.3.1 Contagem de Células Viáveis .....	51



5.3.2 Avaliação da Proliferação Celular por Cristal Violeta .....	51
5.4 QUANTIFICAÇÃO DE mRNA POR RT-qPCR. ....	51
5.4.1 Extração de RNA Total.....	51
5.4.2 Transcrição Reversa para Síntese de cDNA.....	52
5.4.3 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR).....	52
5.4.3.1 Desenho, validação e determinação dos parâmetros dos <i>primers</i> utilizados .....	53
5.5 WESTERN BLOTTING.....	55
5.5.1 Lise das Células e Quantificação de Proteínas .....	55
5.5.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) e Transferência.....	55
5.5.3 Marcação com Anticorpos, Revelação e Quantificação .....	56
5.6 ZIMOGRAFIA EM GELATINA .....	57
5.7 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE INVASIVA .....	57
5.8 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE PROLIFERAÇÃO LIVRE DE ADESÃO .....	58
5.9 SELEÇÃO E ANÁLISE DE DADOS DE EXPRESSÃO DEPOSITADOS.....	59
5.9.1 Análise de Dados de Microarranjos.....	59
5.9.2 Análise de Dados de RNA-Seq .....	60
<b>6 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>61</b>
6.1 EXPRESSÃO DE <i>RECKA</i> , <i>MMPs</i> E <i>TIMPs</i> EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE MELANOMA HUMANO .....	61
6.1.1 Alterações nos Perfis de Expressão de <i>MMPs</i> e Seus Inibidores nos Estágios Iniciais da Transformação do Melanócito .....	61
6.1.2 Alterações nos Perfis de Expressão de <i>MMPs</i> e seus Inibidores na Progressão de Melanoma Primário para Melanoma Metastático .....	64
6.1.3 Relação Entre a Expressão Residual de <i>RECKA</i> e a Expressão de Genes Envolvidos em Processos Invasivos .....	67
6.2 PAPEL DO TRANSCRITO ALTERNATIVO <i>RECKB</i> EM MELANOMA .....	68
6.2.1 Validação do Silenciamento Específico da Expressão de <i>RECKA</i> e <i>RECKB</i> .....	69
6.2.2 Validação das Linhagens com Superexpressão de <i>RECKB</i> .....	72
6.2.3 Efeito da Modulação dos Níveis de <i>RECKA</i> e <i>RECKB</i> na Proliferação Celular .....	74
6.2.4 Expressão de <i>MMPs</i> e seus Inibidores Frente à Superexpressão ou ao Silenciamento dos Transcritos de <i>RECK</i> .....	76
6.2.5 Atividade Gelatinolítica em Células de Melanoma com Níveis Modulados de <i>RECKA</i> ou <i>RECKB</i> .....	78
6.2.6 Capacidade Invasiva das Linhagens com Expressão Modulada de <i>RECKA</i> e <i>RECKB</i> .....	81

6.2.7 Efeito dos Transcritos do Gene <i>RECK</i> na Capacidade de Proliferação Livre de Adesão .....	83
6.3 REGULAÇÃO DA RAZÃO <i>RECKB/RECKA</i> .....	85
6.3.1 Regulação por Vias de Sinalização Oncogênicas .....	85
6.3.2 Regulação do <i>Splicing</i> Alternativo do Transcrito Primário do Gene <i>RECK</i> .....	89
6.3.3 <i>RECKB</i> como Alvo de microRNAs .....	92
<b>7 DISCUSSÃO FINAL</b> .....	<b>94</b>
<b>8 CONCLUSÕES</b> .....	<b>109</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>110</b>
<b>APÊNDICE</b> .....	<b>124</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O melanoma é a neoplasia maligna do melanócito. Apesar de representar cerca de 5% do total de cânceres de pele, é responsável por 90% das mortes por cânceres de pele registradas. Isto se deve à elevada tendência do melanoma à sofrer metástases (GRAY-SCHOPFER *et al.*, 2007). Estima-se que apenas 15-20% dos pacientes com melanoma metastático sobrevivam mais que cinco anos, e que apenas 10-15% sobrevivam mais que dez (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014). Um dos alvos mais promissores para a terapia deste tipo de tumor é a via das quinases ativadas por mitógenos (MAPK). Esta via encontra-se constitutivamente ativada em cerca de 80% dos melanomas, e esta ativação constitutiva promove a proliferação celular e a fuga da apoptose, além de favorecer a produção de metaloproteases de matriz (MMPs), responsáveis pela desestruturação da matriz extracelular, facilitando a invasão tecidual pelas células tumorais. Além disso, ao passo que as MMPs são produzidas, seus inibidores são silenciados (HOFMANN *et al.*, 2005b). Os principais inibidores de MMPs são os inibidores teciduais de metaloproteases (TIMPs), que são solúveis, e RECK, que se destaca pela sua ligação covalente à superfície da célula.

O gene *RECK* é descrito como um supressor de metástases por dar origem à um regulador negativo de MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP (TAKAHASHI *et al.*, 1998; OH *et al.*, 2001). Estas metaloproteases, por sua vez, estão diretamente implicadas em processos invasivos de diversas neoplasias, inclusive o melanoma. Além disto, vários estudos mostram que a transformação maligna acarreta no silenciamento do gene *RECK* (TAKAHASHI *et al.*, 1998), e que este silenciamento é mediado pela sinalização de oncoproteínas, como Ras, uma quinase da via MAPK (SASAHARA *et al.*, 1999a; SASAHARA *et al.*, 1999b). A manutenção de níveis de expressão residual elevada de *RECK* após a transformação maligna correlaciona com um melhor prognóstico para os pacientes de diversas neoplasias (NODA e TAKAHASHI, 2007).

Recentemente foram identificados transcritos originados do *splicing* alternativo do pré-mRNA de *RECK*. Um destes transcritos, *RECKB*, parece codificar uma proteína ancorada covalentemente à membrana, de forma semelhante à da proteína traduzida do transcrito canônico, *RECKA*. Dados prévios obtidos por este grupo indicam que a razão *RECKB/RECKA* é mais elevada em linhagens de

melanoma metastático do que em linhagens de melanoma primário (JACOMASSO, 2010).

Apesar de RECKA inibir MMPs fortemente envolvidas no estabelecimento e na progressão de melanoma, e de ser silenciado por uma via que encontra-se alterada em 80% dos casos deste tipo de tumor, não há informações sobre os níveis de expressão do gene *RECK* e nem sobre o seu papel no desenvolvimento ou na progressão do melanoma. Além disto, a função do transcrito alternativo *RECKB* e a forma como a razão *RECKB/RECKA* é modulada durante a metástase ainda não são compreendidas.

Desta forma, a relação do gene *RECK* com a formação e a progressão do melanoma, bem como o papel e a regulação de seus transcritos canônico e alternativo em melanoma devem ser elucidados.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 MELANOMA

#### 2.1.1 Definição, Fatores de Risco, Prevalência e Morbidade

O melanoma é a neoplasia maligna do melanócito, a célula produtora do pigmento melanina que está presente na pele, nos olhos e em outros tecidos (GRAY-SCHOPFER *et al.*, 2007). Apesar de ser o tipo menos prevalente de câncer de pele, o melanoma é o responsável pelo maior número de mortes, devido à sua elevada tendência a sofrer metástases (AMERICAN CANCER SOCIETY - ACS, 2014).

O desenvolvimento do melanoma é definido por fatores como a predisposição genética, a cor da pele e o comportamento com relação à exposição à radiação ultravioleta (UV) (ACS, 2014). O relatório de estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) concluiu que, no Brasil, o câncer de pele é o tipo mais comum entre homens e mulheres. Estimou-se que em 2014 serão diagnosticados 98.420 novos casos de cânceres de pele em homens e 83.710 entre mulheres (INCA, 2013). Isto representa um aumento significativo nos últimos quatro anos, uma vez que a estimativa para o ano de 2010 era de 53.410 novos casos entre homens e 60.440 entre as mulheres (INCA, 2009). Dentre os cânceres de pele, os melanomas são os menos prevalentes: 2.960 e 2.930 novos diagnósticos em homens e em mulheres, respectivamente, foram previstos para 2014. A principal área de incidência de melanoma, no Brasil, é a região Sul (INCA, 2013).

A taxa de sobrevida após 5 anos de melanomas diagnosticados nos estágios iniciais é de 97%. Porém, após a metástase, esta taxa cai para 15-20%. A sobrevida após 10 anos estimada para pacientes com melanoma metastático é de 10-15% (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2013).

#### 2.1.2 Patogênese e Progressão

Os melanócitos saudáveis crescem ao longo da lâmina basal – a camada que separa a epiderme da derme, e interagem com ela através de moléculas de adesão que ligam-se especificamente aos seus componentes (HAASS *et al.*, 2005). Além de melanócitos, a epiderme também é composta por queratinócitos – células altamente queratinizadas e que, por isso, conferem a resistência mecânica característica da

pele. A pigmentação dos tecidos pelos melanócitos ocorre quando o material genético dos queratinócitos sofre dano pela radiação UV. Estes danos no material genético, que podem levar à tumorigênese, induzem a ativação do supressor tumoral p53, que por sua vez ativa a expressão da pro-opiomelanocortina (POMC). POMC sofre um processamento proteolítico para formar o hormônio estimulador de melanócitos (*melanocyte stimulating hormone* – *MSH*). Este hormônio liga-se a um receptor na superfície do melanócito, desencadeando uma cascata de sinalização que estimula a produção do pigmento melanina (CUI *et al.*, 2007). A melanina é então secretada na forma de melanossomos, que são internalizados pelos queratinócitos, protegendo o seu núcleo contra novos danos causados pela radiação UV nos cromossomos (FIGURA 1), além de proteger também as células das camadas mais profundas da epiderme, como o próprio melanócito. O principal fator de risco para o desenvolvimento do melanoma é a exposição intermitente à radiação UV intensa, que danifica o material genético das células sem promover estímulos suficientes para produzir melanina em níveis adequados para proteção do tecido. A radiação UV pode causar diversos tipos de dano ao material genético, como quebras de dupla-fita e modificações de nucleotídeos, que nem sempre podem ser reparados pela maquinaria celular. Estes danos, por sua vez podem levar a mutações, deleções e translocações no genoma das células (GARIBYAN e FISHER, 2010).

A tumorigênese ocorre quando as alterações do genoma da célula induzem a perda de função de genes supressores de tumor ou o ganho de função de proto-oncogenes (HANAHAHAN e WEINBERG, 2000). As mutações mais frequentes em melanoma ocorrem nos proto-oncogenes *n-ras* (15% dos casos) e *BRAF* (62% dos casos) (DAVIES *et al.*, 2002). Ambos os genes estão envolvidos na mesma via de transdução de sinal intracelular, conhecida como via das proteína quinases ativadas por mitógenos (*mitogen activated protein kinases* – MAPK). Esta via consiste em uma cascata de quinases que regulam vias relacionadas à proliferação e ao crescimento celular. As mutações em Ras ou Raf fazem com que estas quinases tornem-se constitutivamente ativas, tornando-se insensíveis à regulação e promovendo estímulo contínuo ao crescimento.

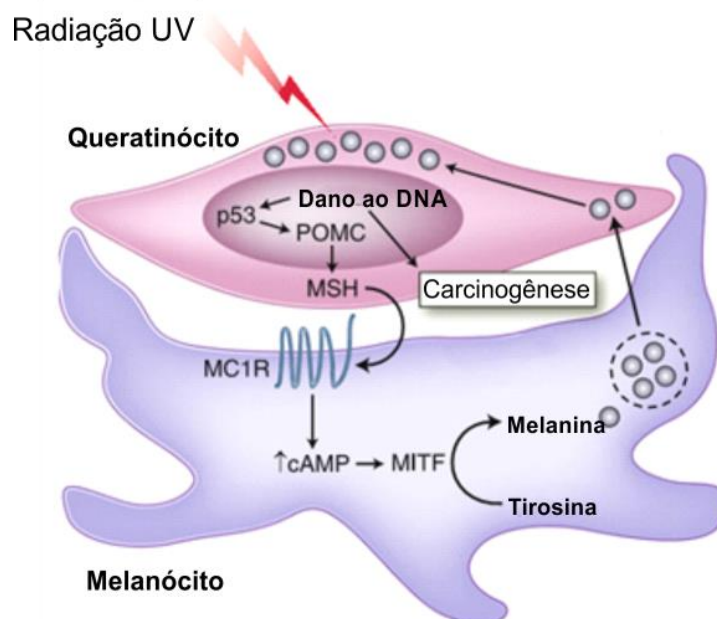


FIGURA 1 – INTERAÇÃO ENTRE QUERATINÓCITO E MELANÓCITO

FONTE: Adaptado de Garibyan e Fisher (2010)

NOTA: A radiação ultravioleta (UV) provoca danos ao material genético do queratinócito, o que ativa p53. Quando ativada, p53 estimula a produção de POMC (pró-opiomelanocortina), que é processada para dar origem ao hormônio estimulador de melanócitos (*melanocyte stimulating hormone* – MSH). O MSH é secretado e ativa um receptor no melanócito, o que leva à ativação de uma cascata de sinalização intracelular que ativa a síntese da melanina.

Em geral, ativações de oncogenes por si só não são suficientes para o desenvolvimento de melanoma. Isto devido à existência, nas células, de mecanismos de controle de proliferação. Melanócitos com oncogenes ativos, mas com estes mecanismos de controle de proliferação intactos, proliferam por um certo tempo, mas entram em um processo conhecido como senescência celular induzida por oncogene (MOOI e PEEPER, 2006). Células senescentes são impedidas de iniciar a fase G1 do ciclo celular e, portanto, não proliferam. As colônias de melanócitos senescentes dão origem aos *nevi*. (MILLER e MIHM, 2006). Um dos envolvidos neste controle da proliferação é *CDKN2A*. Este *locus* codifica dois supressores tumorais: p16<sup>INK4A</sup> e p14<sup>ARF</sup>. p16<sup>INK4A</sup> é um inibidor de quinase dependente de ciclina (*cyclin-dependent kinase* – CDK)-4 e CDK6. Estas CDKs fosforilam a proteína Rb, que então libera o fator de transcrição E2F. Este fator de transcrição promove a expressão de genes que permitem que a célula avance da fase G1 para a fase S do ciclo celular, onde ocorre a replicação do DNA. Portanto, p16<sup>INK4A</sup> inibe a progressão do ciclo celular, direcionando a célula para a senescência. Já p14<sup>ARF</sup> promove a estabilização da proteína p53. Esta por sua vez ativa a expressão de enzimas de reparo de DNA,

proteínas indutoras de apoptose ou a expressão de p21, outro inibidor de CDKs que promove parada no ciclo. O locus *CDKN2A* encontra-se inativado em 30-70% dos casos de melanoma (SHARPLESS e CHIN, 2003).

Outra mutação prevalente em melanoma é a perda da função de *PTEN*. Este gene codifica uma fosfatase que atenua a sinalização da fosfoinositídeo-3-quinase (PI3K). Uma vez ativada, PI3K induz principalmente o crescimento e a sobrevivência da célula, através da indução de proteínas anti-apoptóticas. Ao escapar da apoptose, as células podem proliferar, acumulando e perpetuando alterações no genoma. As deleções de *PTEN* ocorrem em até 20% dos melanomas (WU *et al.*, 2003).

Após o seu estabelecimento, o melanoma pode apresentar progressão por diversas fases, cada uma com aspectos histopatológicos característicos (GRAY-SCHOPFER *et al.*, 2007). Nas fases iniciais e menos agressivas do melanoma, as células proliferam descontroladamente, mas se limitam a crescer ao longo da lâmina basal. Este perfil de crescimento é denotado como crescimento radial (*radial growth profile – RGP*) (CLARK *et al.*, 1984). A alta taxa de divisão e o escape das etapas de checagem do ciclo celular permitem que as células tumorais acumulem mutações. Células de um melanoma RGP podem gerar populações capazes de degradar e atravessar a lâmina basal, invadindo a derme. Estas células passam a formar tumores que atingem tecidos mais profundos da pele, e por isto são consideradas de crescimento vertical (*vertical growth profile – VGP*) (CLARK *et al.*, 1984). A desestruturação da lâmina basal permite a passagem, para a derme, de fatores de crescimento produzidos por queratinócitos, estimulando o crescimento dos melanócitos (CROWSON *et al.*, 2007). Isso permite que as células continuem com seus ciclos ativados e mantenham as taxas de divisão. O acúmulo de alterações que acarretam em ganhos de funções nestas células, eventualmente, gera populações que são capazes de atingir a corrente sanguínea, permanecer viáveis no sangue e colonizar tecidos em órgãos distintos do sítio da lesão inicial, de forma independente da presença dos fatores de crescimento produzidos na epiderme. Este novo tumor, descontínuo do tumor de origem (primário), é conhecido como metástase (MILLER e MIHM, 2006). A FIGURA 2 ilustra as alterações histológicas em cada etapa da progressão do melanoma.

Devido à susceptibilidade dos melanócitos à sofrer danos ao DNA por fatores ambientais, o número de mutações que uma célula de melanoma maligno carrega é maior do que em qualquer outro tipo de câncer (BERGER, MICHAEL F. *et al.*, 2012).



Uma consequência disto é o fato de o melanoma ser heterogêneo, podendo ser melhor caracterizado como um conjunto de diferentes patologias do que por uma única condição (VIDWANS *et al.*, 2011).

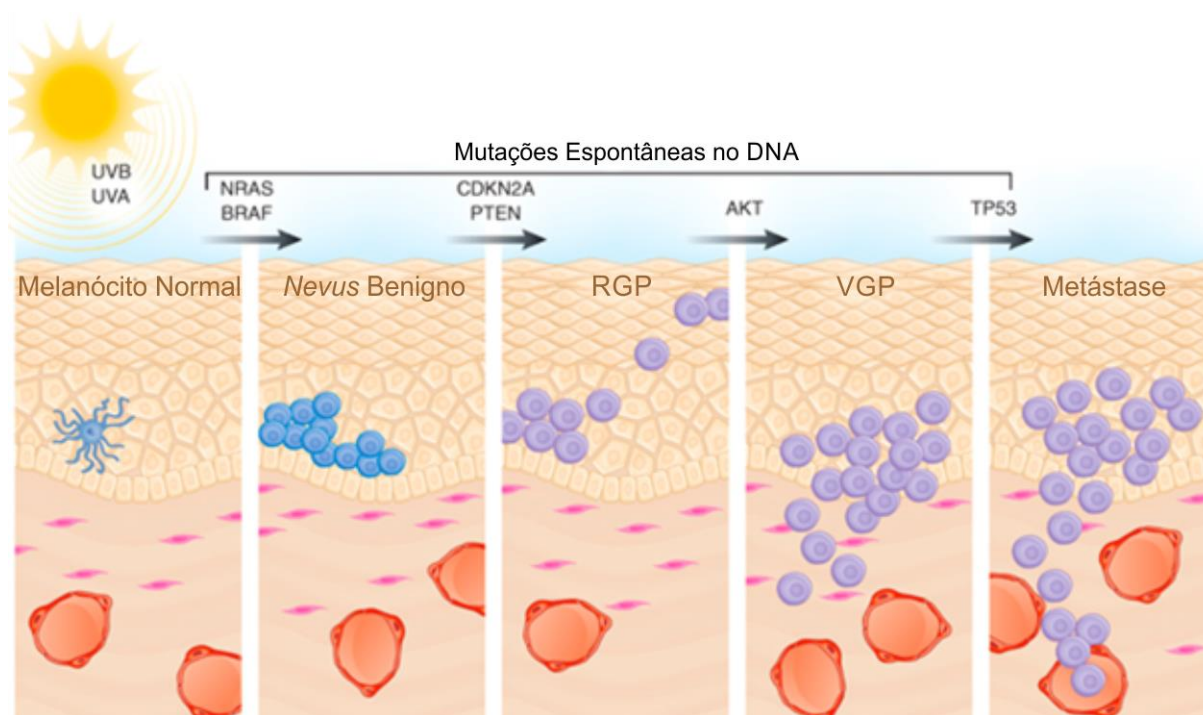


FIGURA 2 – ETAPAS DA PROGRESSÃO DO MELANOMA

FONTE: Adaptado de Zaidi *et al.* (2008).

NOTA: De acordo com o modelo proposto por Clark *et al.* (1984), os estágios da progressão do melanoma são divididos com base nas características histológicas da lesão. Na fase de crescimento radial (*radial growth profile* – RGP) a proliferação continua confinada às imediações da lâmina basal, diferentemente do que ocorre na fase de crescimento vertical (*vertical growth profile* – VGP). A última fase do modelo é a metástase, quando as células tumorais se desprendem do tumor original e colonizam tecidos distantes.

Uma das características marcantes do melanoma é a sua elevada tendência de invadir tecidos e gerar metástases. A matriz extracelular (MEC) possui um papel importante nestes processos, servindo de suporte para a migração e como uma barreira física que impede a passagem de células e limita a difusão de fatores de crescimento e outras moléculas sinalizadoras (EGEBLAD e WERB, 2002). A capacidade do melanoma de desorganizar a MEC ao seu redor se deve, dentre outros fatores, ao aumento da expressão de metaloproteases de matriz extracelular (*matrix metalloproteinases* - MMPs) – uma família de proteases capaz de degradar os componentes da MEC, desestabilizando os tecidos, facilitando a invasão e liberando fatores de crescimento imobilizados nesta matriz (HOFMANN *et al.*, 2005b; NAGASE

*et al.*, 2006). Além da degradação da MEC, as MMPs (particularmente a MMP-9) estimulam a vascularização dos tumores (HESLING *et al.*, 2004).

A interação dos melanomas com a MEC também é alterada. Melanomas mais agressivos expressam conjuntos específicos de moléculas de adesão célula-matriz, conhecidas como integrinas. Quando estas integrinas interagem com um componente específico da MEC elas atuam como receptores, ativando vias de sinalização intracelulares. A integrina  $\alpha\beta_3$  é um marcador conhecido de melanomas mais agressivos (DANEN *et al.*, 1994). Ela liga-se à vitronectina e ativa uma cascata de sinalização que resulta no aumento da expressão de MMPs (BROOKS *et al.*, 1996) e na inibição da apoptose, o que favorece o acúmulo de mutações nas células (PETITCLERC *et al.*, 1999).

### 2.1.3 Vias de Sinalização em Melanoma

Apesar de diversas mutações terem sido descritas em melanoma, as mais comuns ocorrem em componentes das vias de sinalização de MAPK e de PI3K, ambas com potencial de induzir proliferação e sobrevivência das células, além de regularem diversos genes envolvidos na interação da célula com seu microambiente (REGAD, 2013). Maiores detalhes destas vias são discutidos a seguir.

#### 2.1.3.1 Via das quinases ativadas por mitógenos (MAPK)

A via das MAPK, composta pelo eixo de sinalização Ras/Raf/MEK/ERK, encontra-se constitutivamente ativada em cerca de 80% dos melanomas. Nesta via, a GTPase Ras é ativada no lado interno da membrana citoplasmática, como resposta à ligação de fatores de crescimento à receptores do tipo tirosina quinase. A forma inativa de Ras é ligada à uma molécula de guanosina difosfato (GDP). A transição para a forma ativa requer a troca de GDP por guanosina trifosfato (GTP), mediada por fatores de troca de nucleotídeos de guanina (*guanine-nucleotide exchange factors* – GEFs). A posterior inativação é estimulada por ativadores de GTPases (*GTPase-activating proteins* – GAPs), que estimulam Ras a hidrolisar GTP, voltando ao estado inativado, GDP-ligado. A mutação mais comum em Ras envolve a troca do resíduo de leucina na posição 61 por um resíduo de glutamina (Q61L), que promove a ativação

constitutiva desta quinase por estabilizar a sua forma GTP-ligada (SOLUS e KRAFT, 2013).

Uma vez ativada, a quinase Ras fosforila e ativa a quinase Raf. Das três isoformas de Raf encontradas em mamíferos, a mais importante em melanoma é a isoforma B-Raf, que carrega a mutação mais comum neste tipo de tumor. Esta mutação troca um resíduo de ácido glutâmico da posição 600 por um resíduo de valina (V600E), que mantém B-Raf em uma conformação que permite a fosforilação de seus substratos de forma independente da fosforilação por Ras. <sup>V600E</sup>B-Raf é cerca de 500 vezes mais ativa que a forma não mutada (WAN *et al.*, 2004).

B-Raf ativa as quinases MEK1/2 (*Mitogen-stimulated external signal-regulated kinase*), que por sua vez fosforilam ERK1/2 (*external signal-regulated kinase*), a proteína efetora da via, que pode fosforilar diversos fatores de transcrição e ativar ou inibir uma vasta gama de genes relacionados à proliferação, como o aumento da expressão de CDK4/6 ou diminuição de p16<sup>INK4A</sup>, ou relacionados à sobrevivência, como Bcl-X<sub>L</sub>, um inibidor da apoptose (SOLUS e KRAFT, 2013). Além destes, outros genes, relacionados à capacidade invasiva das células, podem ser ativados ou inibidos por esta via. Como exemplo, podemos citar o aumento da expressão de metaloproteases de matriz extracelular (MMPs), e a concomitante redução na expressão de seus inibidores (MILLER e MIHM, 2006).

Uma vez que mutações ativadoras de Ras e Raf são funcionalmente redundantes, é muito raro que ocorram de forma concomitante na mesma lesão. Sendo assim, estas mutações ocorrem de forma mutuamente exclusiva. Como mutações em pelo menos uma destas quinases estão presentes em uma grande parcela dos casos de melanoma, diversos inibidores da via das MAPK foram desenvolvidos, com o intuito de controlar a proliferação do melanoma. Após vários fracassos, um inibidor da forma mutada de BRAF, vemurafenib, foi aprovado para uso clínico, com resultados promissores. Porém, o tratamento prolongado com este inibidor desencadeia o estímulo da proliferação por outros intermediários que não B-Raf, gerando resistência por mecanismos ainda não totalmente compreendidos. Este fato ilustra a complexidade das redes de sinalização presentes no melanoma (GIBNEY *et al.*, 2013).

### 2.1.3.2 Fosfoinosítideo-3-quinase (PI3K)

Mutações que alteram a sinalização de PI3K também são frequentes em melanoma (DAVIES, 2012). Esta enzima, que pode ser ativada por vários tipos de fatores de crescimento, adiciona um fosfato na posição 3 do anel do Fosfoinosítideo-(4,5)-difosfato ( $\text{PIP}_2$ ), formando fosfoinosítideo-(3,4,5)-trifosfato ( $\text{PIP}_3$ ) na membrana citoplasmática. O aumento dos níveis de  $\text{PIP}_3$  é reconhecido por diversas proteínas que possuem o motivo de homologia à *plekstrin* (*plekstrin homology* – PH). O reconhecimento das moléculas de  $\text{PIP}_3$  pode ativar estas proteínas, que então dão continuidade à transdução de sinal.

Das diversas proteínas que possuem os motivos PH, a mais importante em melanoma é Akt (também chamada de proteína quinase B, ou PKB), que encontra-se superexpressa em 60% dos melanomas (STAHL *et al.*, 2004). O aumento na concentração de  $\text{PIP}_3$  recruta Akt para a superfície interna da membrana plasmática. Uma vez lá, serve como substrato para PDK-1 (*phosphoinositide-dependent kinase*), outra proteína com os motivos PH, que fosforila Akt e diversas outras proteínas, mediante sinalização de  $\text{PIP}_3$ . Uma vez ativada, Akt inibe p21 e p27, reguladores do ciclo celular. Além disto, Akt promove a ativação do complexo do alvo de rapamicina em mamíferos (*mammalian target of rapamycin* – mTOR), que por sua vez induz genes que aumentam o metabolismo celular e a síntese de proteínas, de forma a facilitar o crescimento e a proliferação das células (DAVIES, 2012). A superexpressão induzida de Akt é suficiente para transformar um melanoma de crescimento radial em um melanoma de crescimento vertical (GOVINDARAJAN *et al.*, 2007)

A sinalização mediada por  $\text{PIP}_3$  é cessada pela fosfoinosítideo fosfatase PTEN, que hidrolisa o fosfato da posição 3, formando  $\text{PIP}_2$ . PTEN encontra-se inativado em 5-20% dos melanomas. De forma interessante, assim como mutações em Ras e RAF, mutações em Ras e em PTEN também são mutuamente exclusivas. Isto porque Ras pode ativar certas isoformas de PI3K, possuindo função redundante à deleção de *PTEN*. Por outro lado, cerca de 20% dos melanomas que possuem mutações ativadoras em BRAF também apresentam inativação de PTEN, o que corrobora o modelo de que mutações em B-Raf e em PTEN ativam as vias independentemente, possuindo efeitos aditivos sobre a proliferação do melanoma (GRAY-SCHOPFER *et al.*, 2007).

## 2.2 METALOPROTEASES DE MATRIZ EXTRACELULAR

### 2.2.1 Definição e Estrutura

As metaloproteases de matriz extracelular (MMPs) – também conhecidas como matrixinas – são uma família de proteases dependentes de zinco. Como um conjunto, essas proteases são capazes de degradar praticamente todos os componentes da matriz extracelular. Alguns membros desta classe de proteases possuem alguma seletividade quanto ao substrato, mas em geral, os espectros de ação das MMPs se sobrepõem (DERYUGINA e QUIGLEY, 2006; NAGASE *et al.*, 2006). As matrixinas, juntamente com as serralisinas, adamalisinas e as astracinas, compõem uma superfamília de proteases conhecida como metzincinas (STAMENKOVIC, 2003).

As MMPs podem ser solúveis ou possuir domínios transmembrana (*membrane-type* – MT-MMPs). Mesmo MMPs solúveis podem estar localizadas transitória ou permanentemente junto à membrana citoplasmática, através de interações com outras proteínas de membrana (NAGASE *et al.*, 2006).

De modo geral, MMPs são produzidas e secretadas como zimogênios. Estes contêm um peptídeo-sinal, que direciona a proteína recém-traduzida para a secreção, e um pró-peptídeo, seguido pelo domínio catalítico, onde se liga o  $Zn^{2+}$  (BODE *et al.*, 1999; CHAKRABORTI *et al.*, 2003). Os pró-peptídeos das MMPs possuem um resíduo de Cys que liga o íon  $Zn^{2+}$  catalítico, o que torna as enzimas inativas (SPRINGMAN *et al.*, 1990). A FIGURA 3 mostra um esquema dos domínios característicos das MMPs.

A clivagem do pró-peptídeo, que converte o zimogênio em MMP ativa, é catalisada por outras proteases. Em vários casos esta clivagem é catalisada por outras MMPs (NAGASE *et al.*, 2006). Este fato pode ser exemplificado com o mecanismo de ativação da MMP-2, no qual a primeira clivagem é mediada por um complexo formado por MT1-MMP – uma metaloprotease ligada à membrana – e por TIMP-2 (Inibidor tecidual de metaloprotease-2, que quando fora deste complexo atua inibindo MMPs). Este complexo desestabiliza a pré-pró-MMP-2 enquanto outra molécula de MT1-MMP cliva o peptídeo, formando a pró-MMP-2 (STRONGIN *et al.*, 1995; BUTLER *et al.*, 1998), que sofre, autoproteólise e libera o peptídeo ativo (DERYUGINA e QUIGLEY, 2006). MMP-2, por sua vez, é uma das proteases capazes

de clivar o pró-peptídeo da pró-MMP-9 (VAN DEN STEEN *et al.*, 2002). MMP-2 e MMP-9 (também conhecidas como gelatinases A e B, respectivamente), são as MMPs mais implicadas com a invasividade tumoral (YOON *et al.*, 2003).

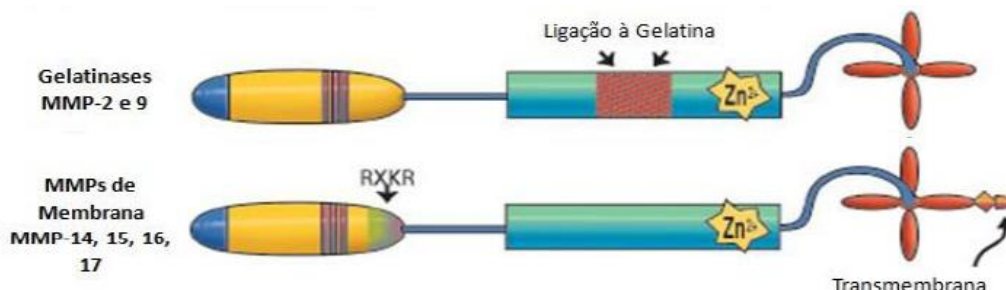


FIGURA 3 – DOMÍNIOS ESTRUTURAIS DAS METALOPROTEASES DE MATRIZ EXTRACELULAR  
FONTE: Adaptado de Vu e Werb (2000)

NOTA: O esquema mostra os domínios das gelatinases (MMP-2 e MMP-9) e das metaloproteases de membrana (particularmente MMP-14). A porção N-terminal das proteínas constituem o peptídeo sinal e o pró-peptídeo (domínios azuis e amarelos, respectivamente), que são clivados quando ocorre a ativação das metaloproteases. A indicação RXKR, na representação das MT-MMPs indica o sítio de clivagem por furina, ausente nas gelatinases, assim como a porção transmembrana.

### 2.2.2 Funções e Regulação

A atividade das MMPs é importante em processos fisiológicos como cicatrização, angiogênese e migração celular (como a que ocorre com as células do sistema fagocitário). Além disto, a degradação da MEC libera fatores de crescimento que ficam nela retidos, aumentando a disponibilidade destes fatores para que se liguem aos receptores da superfície da célula (VU e WERB, 2000).

A homeostase da MEC depende de diversos mecanismos de controle de expressão, atividade e localização, que permitem regulação estrita do local e do momento em que ocorrerá a degradação (BASBAUM e WERB, 1996; BREW *et al.*, 2000). Quando esta regulação espaço-temporal da atividade proteolítica na MEC é perdida os tecidos têm a sua organização comprometida, o que promove o surgimento das características patológicas de algumas doenças como artrite e câncer. Células tumorais originadas de vários tecidos possuem atividade de MMPs aumentada, incluindo a MT1-MMP, MMP-2 e MMP-9 (FINGLETON, 2006).

A regulação das MMPs ocorre em diversos níveis (NAGASE *et al.*, 2006). A maior parte destas enzimas tem sua expressão aumentada em resposta a citocinas inflamatórias ou fatores de crescimento. Além disto, as etapas de secreção, localização e ativação dos zimogênios também são pontos de checagem, nos quais a

atividade destas proteases pode ser regulada. Mesmo depois de ativadas, as MMPs podem ainda ter sua atividade bloqueada por inibidores secretados pelas células circundantes (DERYUGINA e QUIGLEY, 2006).

A localização precisa da proteólise da MEC é modulada pela associação das MMPs com proteínas de membrana, ou ainda pela mobilização de MT-MMPs para uma dada região da membrana onde haverá degradação da matriz no espaço pericelular (BASBAUM e WERB, 1996; DERYUGINA e QUIGLEY, 2006; NAGASE *et al.*, 2006). Um exemplo da importância da distribuição espacial de MMPs é a mobilização de MT1-MMP para estruturas celulares conhecidas como *invadopodia*, que são projeções da membrana citoplasmática que penetram na matriz extracelular em processos invasivos. A presença da MT1-MMP aumenta a ativação de MMP-2 nas proximidades destas estruturas, de forma que a capacidade proteolítica se torne maior nestas regiões (NAKAHARA *et al.*, 1997). Hofmann *et al.* (2005b) demonstraram que, em melanomas invasivos, MMP-2 e MT1-MMP estavam mais concentrados na interface entre a massa tumoral e o estroma, ilustrando a ativação localizada destas MMPs.

A extensão da degradação da MEC está diretamente relacionada com o balanço entre MMPs e seus inibidores. Os inibidores mais descritos para MMPs são as  $\alpha$ -macroglobulinas, presentes no soro, e as TIMPs (*tissue inhibitors of metalloproteinases*), que atuam nos tecidos (NAGASE *et al.*, 2006).

Das quatro TIMPs identificadas em mamíferos, apenas TIMP-1, TIMP-2 e TIMP-3 são expressas em melanoma (HOFMANN *et al.*, 2000). Estes inibidores são capazes de reduzir a taxa de conversão de pró-MMPs em suas formas maduras. Além disto, podem ligar-se à MMPs ativas, inibindo-as de forma reversível (STETLER-STEVENSON, 2008). Cada TIMP é capaz de inibir um determinado conjunto de metaloproteases de forma eficiente. No que diz respeito às gelatinases, TIMP-1 inibe a conversão da pró-MMP-9 com maior eficiência, enquanto TIMP-2 inibe preferencialmente a conversão da pró-MMP-2 (BREW e NAGASE, 2010). TIMP-3, por sua vez, apresenta algumas características que a distinguem das demais. Ela inibe tanto a conversão da pró-MMP-2 quanto da pró-MMP-9 de forma eficiente. Além disto, TIMP-3 encontra-se predominantemente associada a moléculas da superfície celular ou da matriz extracelular, ao contrário das demais, que encontram-se predominantemente livres no ambiente intercelular (MURPHY, 2011).

Além do papel inibitório sobre MMPs, que pode ser associado à manutenção da integridade da matriz extracelular e, portanto, inibição de processos invasivos, algumas TIMPs podem desempenhar outras funções, independentes da inibição de MMPs (MURPHY, 2011). TIMP-1 promove fuga da apoptose e indução da proliferação em certos tipos celulares (STETLER-STEVENSON, 2008). TIMP-3, por sua vez, é capaz de inibir a angiogênese ao atuar como um antagonista direto de VEGFR2 (*vascular endothelial growth factor receptor 2*) (QI *et al.*, 2003). TIMP-2 também pode atuar como um inibidor da angiogênese, mas através de um mecanismo distinto do de TIMP-3. TIMP-2 liga-se diretamente à integrinas  $\alpha 3 \beta 1$  na superfície de células endoteliais, promovendo parada do ciclo celular na fase G1 e aumento da expressão de p27<sup>Kip1</sup>, conduzindo as células a um estado quiescente (SEO *et al.*, 2006). Estes exemplos ilustram o fato de as TIMPs atuarem por vários mecanismos além da inibição de MMPs.

Outro inibidor descrito mais recentemente, RECK, possui uma característica única dentre os inibidores de MMPs: é uma proteína ligada covalentemente à membrana citoplasmática, capaz de inibir MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP (TAKAHASHI *et al.*, 1998; OH *et al.*, 2001) e MMP-7 (OMURA *et al.*, 2009). A perturbação deste equilíbrio entre enzimas proteolíticas e seus inibidores é um dos fatores que colaboram para a manifestação de características morfológicas do câncer e de outras doenças como artrite e algumas desordens neurológicas (BASBAUM e WERB, 1996; BREW *et al.*, 2000).

### 2.2.3 Papel das Metaloproteases no Melanoma

Níveis altos de expressão de MT1-MMP, MMP-2 e MMP-9 correlacionam com o aumento da capacidade de invasão de melanomas em amostras teciduais de pacientes (MACDOUGALL *et al.*, 1995; IIDA *et al.*, 2004; HOFMANN *et al.*, 2005b). Apesar de as MMPs serem mais expressas em melanomas do que em melanócitos normais, grande parte das metaloproteases presentes no microambiente tumoral tem origem nas células do estroma, particularmente em fibroblastos e queratinócitos (HOFMANN *et al.*, 2005a). Em melanomas, as metaloproteases de matriz atuam na degradação da lâmina basal, que separa a epiderme da derme e que é constituída de, entre outras moléculas, colágeno tipo IV e fibronectina, substratos para estas MMPs (IIDA *et al.*, 2004).



Estudos *in vivo* demonstraram que a expressão da forma ativa de MMP-2 correlaciona positivamente com a capacidade metastática de linhagens de melanoma humano (MV3 e BLM), sugerindo que a maior expressão de MMP-2 colabora para a progressão do melanoma (HOFMANN *et al.*, 1999). A expressão do transcrito de *MMP2* em linhagens de melanoma é estimulada pela sinalização da integrina  $\alpha_v\beta_3$ , que é mais expressa em melanomas mais agressivos (SEFTOR *et al.*, 1993; BROOKS *et al.*, 1996). Além de estimular a expressão de *MMP2*, esta integrina associa-se à forma ativa da MMP-2, retendo-a na superfície da célula. Esta interação provoca ainda a redução da afinidade da integrina ao seu substrato, a vitronectina (um componente da matriz extracelular), e facilita a migração de tumores de crescimento vertical e metastáticos (BROOKS *et al.*, 1996).

Linhagens de melanoma que expressam MMP-9 constitutivamente apresentaram maior quantidade de metástases nos pulmões quando implantadas em camundongos imunodeficientes (MACDOUGALL *et al.*, 1995). Por outro lado, é frequente encontrar tumores metastáticos com expressão desta metaloprotease menor do que em tumores primários (HOFMANN *et al.*, 2000; IIDA *et al.*, 2004). Portanto, MMP-9 parece ser importante quando o tumor primário origina uma metástase, mas níveis altos não são necessários para a manutenção da lesão metastática (HOFMANN *et al.*, 2005a).

## 2.3 RECK

### 2.3.1 Características Estruturais e Funções

O gene *RECK* (*reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs*) foi inicialmente descrito como um supressor de tumor, devido à sua capacidade de reverter o fenótipo tumoral induzido pelo oncogene *v-Ki-Ras* em fibroblastos murinos (TAKAHASHI *et al.*, 1998). A reversão deste fenótipo foi, então, associada, em parte, ao efeito inibitório de RECK sobre MMP-2 e MMP-9, além de MT1-MMP (TAKAHASHI *et al.*, 1998; OH *et al.*, 2001). Tal efeito inibitório reduz a degradação das proteínas da MEC causada por células tumorais, reduzindo desta forma suas capacidades de migração, invasão tissular e, portanto, sua agressividade (NODA *et al.*, 2003).

RECK antagoniza a ação de MMP-9 inibindo a secreção da sua pró-forma (TAKAHASHI *et al.*, 1998). Este dado foi confirmado por Oh *et al.* (2001), que também

encontraram evidências da inibição de outras duas MMPs: redução dos níveis de MMP-2 por inibição do processamento proteolítico da pró-MMP-2 e; inibição da atividade catalítica da MT1-MMP. Além de inibir a atividade de MT1-MMP diretamente, RECK ainda promove o seu sequestro para os microdomínios de membrana conhecidos como *lipid rafts*, estimulando sua endocitose por uma via característica de proteínas GPI-ancoradas (MIKI *et al.*, 2007).

RECK atua também como um inibidor não competitivo da atividade proteolítica de MMP-2 e MMP-9, por meio de interações físicas (TAKAHASHI *et al.*, 1998; OH *et al.*, 2001). Os meios pelos quais RECK regula a atividade das MMPs são ilustrados na FIGURA 4.

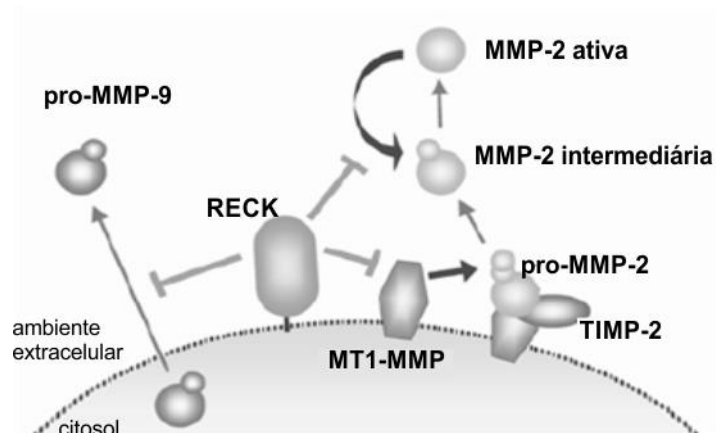


FIGURA 4 – PONTOS DE AÇÃO DE RECK SOBRE A ATIVIDADE DE MMPs

FONTE: Adaptado de Oh *et al.*, (2001)

NOTA: RECK inibe MMPs em diversos níveis. Esta proteína inibe a ação de MMP-9 através da inibição da secreção de sua pro-forma (pró-MMP-9), promove a redução da ativação da pró-MMP-2, inibindo a clivagem desta por MT1-MMP. Por fim, RECK impede a clivagem autoproteolítica de MMP-2. As setas negras indicam ativação, enquanto as barras indicam inibição.

Outras possíveis funções foram propostas para RECK. Esta proteína atua na formação do sistema vascular durante a embriogênese (OH *et al.*, 2001), na manutenção da polaridade das células e na estabilização de adesões focais (MORIOKA *et al.*, 2009), papéis estes relacionados à atividade de inibidor de MMPs. Linhagens de camundongos RECK<sup>-/-</sup> são inviáveis, de forma que os animais morrem por volta da metade do 11º dia do desenvolvimento embrionário, com hemorragia na cavidade abdominal, resultante da deficiência na maturação dos vasos sanguíneos e da desorganização dos tecidos (OH *et al.*, 2001), o que ilustra a importância de RECK nos processos fisiológicos relacionados a manutenção estrutural dos tecidos.

O efeito de RECK sobre a atividade de MMPs promove, ainda, a modulação da ativação de receptores na superfície celular, como a ativação de integrinas  $\beta_1$  (MIKI *et al.*, 2010), e atenuação da sinalização de receptores de fator de crescimento epidermal (EGFR) (KITAJIMA *et al.*, 2011), o que liga RECK à modulação da expressão gênica, através da manutenção dos componentes da MEC. Além disto, RECK interage diretamente com receptores HER-2/Neu, importantes nos processos patológicos da célula de melanoma, e os inibe (DJERF *et al.*, 2009; BOONE *et al.*, 2011; HONG *et al.*, 2011). Estes estudos sugerem que o papel de RECK é mais amplo do que o de um inibidor de proteólise, e o associam diretamente às vias que regulam o ciclo celular e a regulação transcricional de diversos genes.

A correlação negativa entre o nível de expressão de RECK e a agressividade do tumor foi demonstrada em diversos tipos de lesões, como gliomas (CORREA *et al.*, 2006; SILVEIRA CORREA *et al.*, 2010), hepatocarcinomas (FURUMOTO *et al.*, 2001), cânceres de mama (SPAN *et al.*, 2003; FIGUEIRA *et al.*, 2009), de pulmão (TAKENAKA *et al.*, 2004; TAKEMOTO *et al.*, 2007; LONG *et al.*, 2008; PESTA *et al.*, 2009), de intestino (TAKEUCHI *et al.*, 2004; VAN DER JAGT *et al.*, 2006; OSHIMA *et al.*, 2008), de próstata (OHL *et al.*, 2005), de estômago (SONG *et al.*, 2006) e osteosarcomas (KANG *et al.*, 2007). Em geral, uma maior expressão deste gene em tumores confere ao paciente um melhor prognóstico (NODA e TAKAHASHI, 2007).

O produto do gene *RECK* ao qual se atribui a inibição das MMPs e demais funções reportadas é uma glicoproteína com 921 resíduos de aminoácidos, codificada por um transcrito que contém 21 éxons. Sua sequência de aminoácidos apresenta domínios ricos em cisteína e motivos semelhantes a fatores de crescimento e inibidores de serina protease, um dos quais apresenta homologia total com o motivo Kazal, que dá o nome ao gene. Esta proteína encontra-se ancorada à superfície extracelular da membrana plasmática pela ligação de uma molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI) à sua extremidade C-terminal (TAKAHASHI *et al.*, 1998). Evidências sugerem que RECK localiza-se nos *lipid rafts*, na forma de homodímeros, e que esta localização é importante para que esta molécula exerça as suas funções (MIKI *et al.*, 2007; OMURA *et al.*, 2009; HONG *et al.*, 2011).

### 2.3.2 Regulação Transcricional e Pós-Transcricional

A expressão de *RECK* é regulada por vários oncogenes (TAKAHASHI *et al.*, 1998). Sasahara *et al.* (1999a) clonaram a região promotora de *RECK* e identificaram sítios de ligação dos fatores Sp1 e Sp3 como responsáveis pela inibição da transcrição mediada pelo oncogene *ras*. Dois destes sítios estão presentes na região promotora: o primeiro, *upstream* ao sítio de início da transcrição, foi chamado Sp1(A) e o segundo, *downstream* do início da transcrição, Sp1(B). Aparentemente, apenas o sítio Sp1(B) é responsivo à sinalização de Ras, apesar de Ras estimular a ligação de Sp1 e Sp3 a ambos os sítios (SASAHARA *et al.*, 1999a; SASAHARA *et al.*, 1999b; SASAHARA *et al.*, 2002). Posteriormente, foi demonstrado que Ras pode atuar também por mecanismos epigenéticos para promover o silenciamento do gene *RECK*. Foi demonstrado que a repressão de *RECK* por Ras pode ser mediada pela modificação da cromatina, através da modificação de histonas, promovida pela histona desacetilase (HDAC) (LIU *et al.*, 2003; CHANG *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2010). Além disto, Chang *et al.* (2006) demonstrou que Ras induz a DNA-metiltransferase 3b, que promove a metilação da região promotora do gene *RECK*, silenciando-o. Após estas descobertas, vários estudos associaram o status de metilação do promotor de *RECK* com a agressividade de tumores de pulmão (CHANG *et al.*, 2007), de cólon (CHO *et al.*, 2007), de boca (KATO *et al.*, 2008; LONG *et al.*, 2008) e de mama (HILL *et al.*, 2011). Liu *et al.* (2008b), porém, mostrou que o promotor de *RECK* em amostras clínicas de melanoma não é hipermetilado. Mais recentemente foram descritos mecanismos de regulação pós-transcricional, através do controle da degradação do mRNA mediado por microRNAs. miR-21, um oncomir (um microRNA envolvido em transformações malignas), é estimulado por Ras e promove aumento da agressividade tumoral através do silenciamento de RECK (GABRIELY *et al.*, 2008; LOAYZA-PUCH *et al.*, 2010).

Como Ras é um ponto de convergência da sinalização de vários fatores de crescimento, a transcrição de *RECK* está sujeita a regulação por vários receptores. Um desses receptores, HER-2/Neu (ErbB2), é codificado por um proto-oncogene e é um importante marcador tumoral (HSU *et al.*, 2006). Por fim, algumas pequenas moléculas são capazes de promover a regulação de RECK. Alguns exemplos incluem a sinvastatina (BARBOSA, 2010; KENSKI, 2013), anti-inflamatórios não-esteroidais (AINEs) (LIU *et al.*, 2002) e o flavonóide quercetina (AMSTALDEN, 2011).

### 2.3.3 Transcritos Alternativos de *RECK*

Trombetta-Lima e colaboradores identificaram novos RNAs mensageiros (mRNA) transcritos a partir do gene *RECK* e processados por *splicing* alternativo (dados não publicados), cujas funções ainda são desconhecidas. Estes transcritos alternativos (denominados *RECKB* e *RECKD*, representados de forma esquematizada na FIGURA 5) possuem nove éxons e compartilham os oito primeiros éxons com a forma canônica (denominada *RECKA*). O *splicing* do nono éxon ocorre de forma diferente em cada transcrito alternativo. Portanto, cada transcrito alternativo do gene *RECK* possui um nono éxon exclusivo, com porção 3' UTR distinta e que codifica diferentes sequências de aminoácidos na porção C-terminal das proteínas preditas.

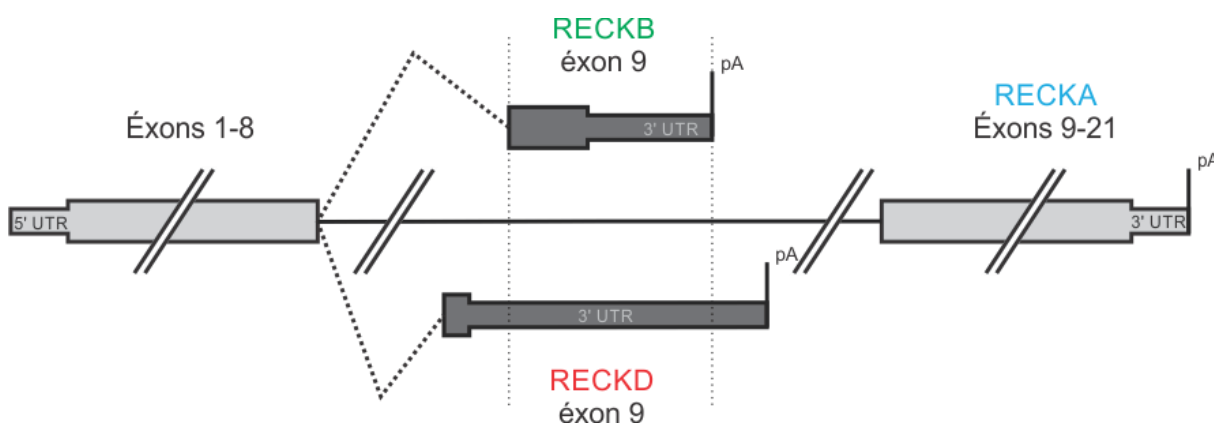


FIGURA 5 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS TRANSCRITOS ALTERNATIVOS DE *RECK*  
FONTE: O Autor.

NOTA: O gene *RECK* pode dar origem a diferentes transcritos, distintos do transcrito canônico de 21 éxons. Estes transcritos alternativos foram preditos a partir de sequenciamentos em larga escala de ESTs (*expressed sequence tags*), e identificados através da ferramenta BLAT (*BLAST-like Alignment Tool*). As isoformas alternativas (*RECKB* e *RECKD*) possuem nove éxons, de forma que o nono éxon de cada um destes transcritos é distinto do dos demais. Sendo assim, são preditos produtos proteicos diferentes para cada transcrito alternativo. O tamanho dos éxons não está em escala.

Das proteínas preditas para estes transcritos alternativos, apenas *RECKB* possui o sinal para o ancoramento à membrana por molécula de GPI, como o presente na forma canônica (TROMBETTA-LIMA *et al.*, dados não publicados). De acordo com estas predições, o possível produto proteico do transcrito *RECKD* seria solúvel. As proteínas alternativas preditas não possuem os motivos Kazal e nem os motivos semelhantes ao EGF. A FIGURA 6 mostra de forma esquemática os domínios proteicos preditos a partir da sequência dos transcritos canônico e alternativos.

Dados gerados em nosso laboratório sugerem que os transcritos alternativos de *RECK* são expressos de forma diferenciada em diferentes condições, e que podem ter funções diferentes das do transcrito canônico. Em um destes projetos foram avaliadas oito linhagens de melanoma quanto à expressão dos transcritos do gene *RECK*, por ensaios de RT-qPCR, e observou-se que a razão entre os transcritos *RECKA* (canônico) e *RECKB* (transcrito alternativo) é significativamente menor em linhagens derivadas de lesões metastáticas do que nas derivadas de tumores primários (JACOMASSO, 2010). Barbosa (2010) observou que culturas de melanoma da linhagem SK-Mel 28 (derivada de metástase) tratadas com sinvastatina (um inibidor da HMG-CoA redutase, enzima que participa da síntese do colesterol) apresentaram redução da viabilidade dose-dependente e alterações no ciclo celular que provocaram um aumento da duração da fase G1. Estes efeitos foram concomitantes com a redução da expressão de *RECKB*, mas sem que houvesse alteração na expressão de *RECKA*. Ainda em nosso laboratório, Kenski (2013) verificou que culturas de linhagens de glioma tratadas com sinvastatina apresentaram, além dos efeitos observados por Barbosa, um aumento dose-dependente nos níveis do transcrito canônico *RECKA*, corroborando com as observações anteriores e indicando a possibilidade de que haja uma regulação oposta destes dois transcritos, por uma via alterada por este fármaco.

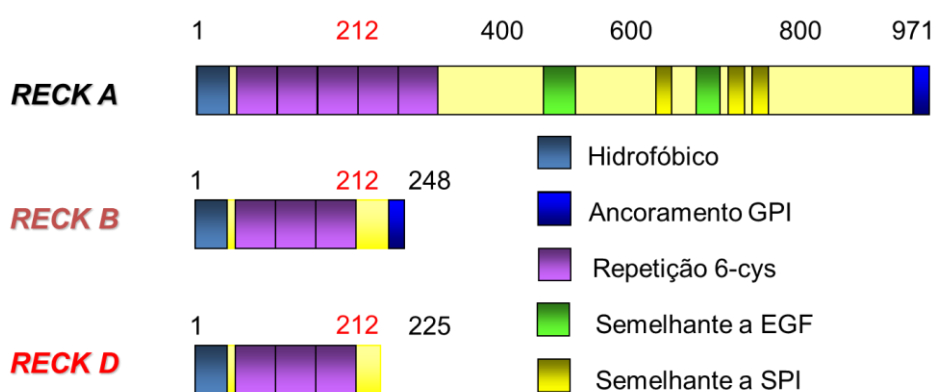


FIGURA 6 – DOMÍNIOS PREDITOS PARA OS PRODUTOS PROTEICOS DOS TRANSCRITOS ALTERNATIVOS DO GENE *RECK*

FONTE: TROMBETTA-LIMA *et al.* (dados não publicados).

NOTA: As proteínas traduzidas dos transcritos alternativos *RECKB*, *RECKD* do gene *RECK* possuem algumas características da proteína canônica (*RECKA*), como a presença da âncora de GPI (*RECKB*) e as repetições de cisteína. Os números indicam a posição aproximada dos resíduos de aminoácidos, e os números em vermelho indicam a posição do último aminoácido da porção comum às três isoformas apresentadas. GPI, glicosilfosfatidilinositol; EGF, fator de crescimento epidermal; SPI, inibidor de serina proteases. O tamanho dos domínios não encontra-se em escala e as posições indicadas são aproximações.

Estes resultados indicam de que o aumento da razão *RECKB/RECKA* possa estar relacionado com um fenótipo mais agressivo do melanoma e de outros tipos de tumores. Porém, a forma com que esta razão modula o comportamento tumoral ainda não foi elucidada.

## 2.4 *SPLICING* ALTERNATIVO

O *splicing* é o processo através do qual são removidos os íntrons e unidos os éxons de um RNA mensageiro precursor (ou pré-mRNA), dando origem a um mRNA maduro. Em cada evento de *splicing* ocorre a remoção de um íntron, através de reações sequenciais de transesterificação (BLACK, 2003). Estas reações são mediadas pelo spliceossomo, um conjunto de moléculas de snRNA (*small nuclear RNA*), cada uma complexada à várias proteínas, formando snRNPs (*small nuclear ribonucleoproteins*). Cada componente do spliceossomo é recrutado de forma ordenada, e deixa o complexo à medida que o processo ocorre, dando lugar a outros elementos responsáveis pela etapa seguinte. Por fim, dois éxons são ligados, liberando o íntron em uma estrutura com forma de laço, através da transesterificação de sua extremidade 5' com uma a posição 2' de uma adenina presente na região chamada de ponto de ramificação (RUSKIN *et al.*, 1984).

O *splicing* alternativo ocorre quando há seleção dos éxons que irão compor o mRNA maduro de um determinado gene, através da indução ou repressão do reconhecimento dos limites de um éxon. Desta forma, um único gene pode dar origem à diversos transcritos distintos, que podem codificar proteínas com funções diferentes ou, até mesmo, opostas (DAVID e MANLEY, 2010; TROMBETTA-LIMA *et al.*, 2013). Estima-se que cerca de 95% dos genes compostos por dois ou mais éxons sofram *splicing* alternativo (PAN *et al.*, 2008), o que explica a divergência entre as complexidades do genoma e do proteoma humanos (LANDER *et al.*, 2001).

A seleção dos éxons pode ocorrer de acordo com reconhecimento de sequências regulatórias no pré-mRNA por fatores reguladores de *splicing* que ao interagir com estas sequências, favorecem ou reprimem o reconhecimento de limites éxon/íntron pelo spliceossomo. Como resultado, um determinado evento de *splicing* pode gerar transcritos alternativos através da utilização de diferentes junções (WANG e BURGE, 2008). As formas como o *splicing* alternativo gera diferentes transcritos são representadas na FIGURA 7.

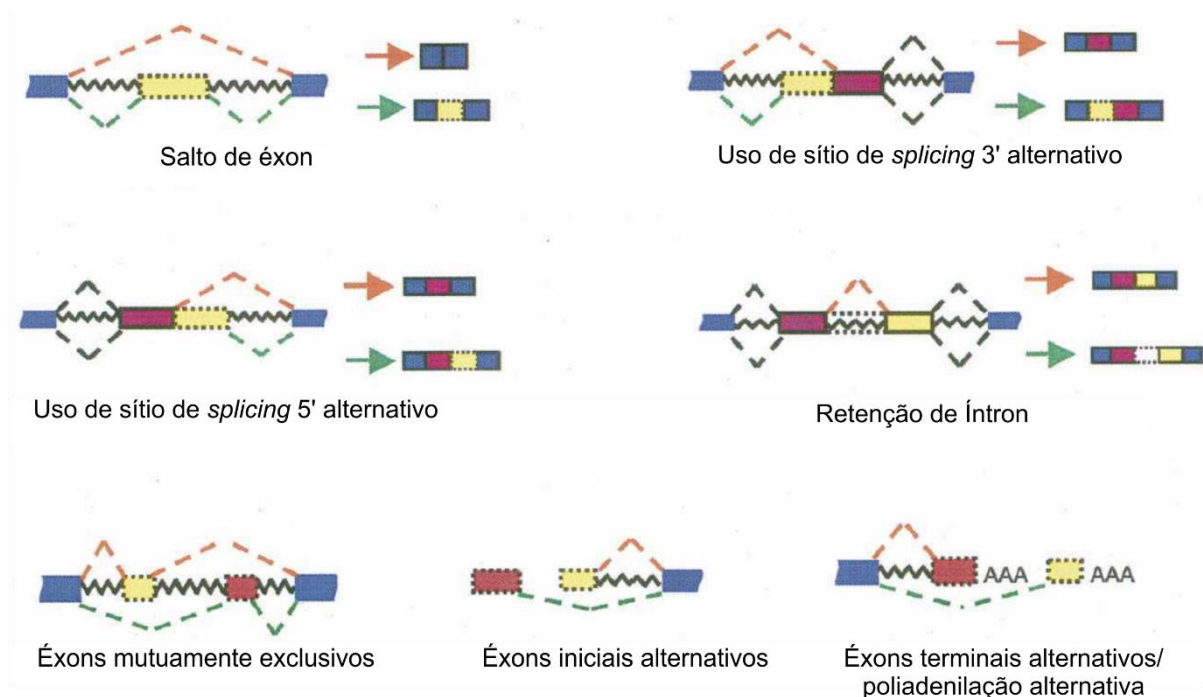


FIGURA 7 – FORMAS DE *SPLICING* ALTERNATIVO

FONTE: Adaptado de Wang e Burge (2008)

NOTA: Representações esquemáticas das formas como pode ocorrer o *splicing* alternativo. Os éxons são representados como retângulos, e as junções possíveis representadas por linhas tracejadas.

O conjunto de éxons expressos em um determinado momento – o exoma – é modulado de forma dinâmica, adaptando o transcriptoma ao contexto em que a célula se encontra. Além disto, o *splicing* pode ser tecido-específico, como é o caso do éxon 2 da tropomiosina- $\alpha$  (TPM1), presente em 95% dos transcritos deste gene na musculatura esquelética, e em 2% dos transcritos na musculatura cardíaca (WANG *et al.*, 2008). Duas famílias de reguladores estão, predominantemente, envolvidas na definição da junção a ser utilizada em um evento de *splicing* alternativo: a das proteínas SR (ricas em serina e arginina) e as ribonucleoproteínas heteronucleares (hnRNP) (BRAUNSCHWEIG *et al.*, 2013). As proteínas SR ligam-se a regiões regulatórias dos éxons conhecidas como indutores exônicos de *splicing* (*exonic splicing enhancers* – ESE), e estão envolvidas no favorecimento da inclusão do éxon, por promover o reconhecimento de sítios de *splicing*. Este efeito é antagonizado pela ligação de hnRNPs aos silenciadores exônicos de *splicing* (*exonic splicing silencers* – ESS), associados à inibição do reconhecimento de sítios de *splicing* e, portanto, impedindo sua inclusão no transcrito maduro. O balanço entre a ativação de proteínas SR ou de hnRNPs direcionam um éxon à inclusão ou a exclusão, e representa uma



importante forma de regulação do *splicing* alternativo. Além dos sítios regulatórios exônicos, ESE e ESS, também existem os sítios intrônicos correspondentes: ISE (*intronic splicing enhancer*) e ISS (*intronic splicing silencer*) aos quais se ligam outros moduladores do *splicing* alternativo (WANG e BURGE, 2008). Esta regulação é esquematizada na FIGURA 8.

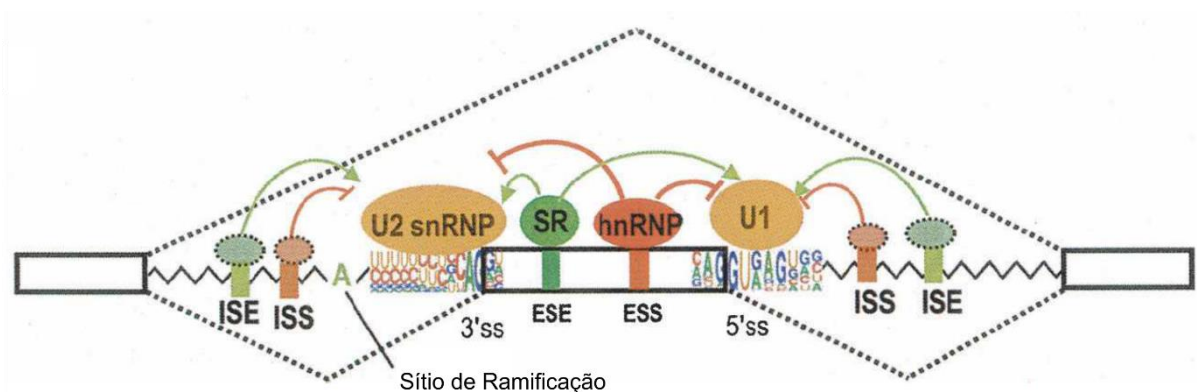


FIGURA 8 – REGULAÇÃO DO *SPLICING* ALTERNATIVO

FONTE: Adaptado de Wang e Burge (2008)

NOTA: Representação esquemática dos elementos regulatórios presentes no pré-mRNA e de seus ligantes. As setas verdes representam o favorecimento da ligação snRNPs U1 e U2 aos sítios de splicing (3' ss e 5' ss) pelos ligantes de elementos indutores de *splicing* (ESE e ISE). As barras vermelhas indicam efeito inibitório sobre as shRNPs pelos ligantes de elementos silenciadores (ESS e ISS).

A perturbação da regulação adequada do *splicing* alternativo é associada à diversas patologias, incluindo o câncer (COOPER *et al.*, 2009). Curiosamente, vários genes envolvidos em processos como a fuga da apoptose, a angiogênese e a proliferação celular, importantes para a biologia tumoral, podem dar origem tanto à transcritos pró quanto à antitumorais (TROMBETTA-LIMA *et al.*, 2013). Tumores ativam programas de *splicing* alternativo que favorecem vários aspectos importantes para o seu desenvolvimento (GERMANN *et al.*, 2012). Como exemplo, podemos citar o *splicing* do pré-mRNA de *BCLX*. A seleção dos limites do éxon 2 pode utilizar um sítio de *splicing* 5' alternativo, produzindo Bcl-X<sub>L</sub>, uma proteína anti-apoptóticas, em detrimento de Bcl-X<sub>S</sub>, com função anti-apoptóticas (BOISE *et al.*, 1993). Em outro exemplo, o *splicing* alternativo de *VEGF* (*vascular endothelial growth factor*), importante no estímulo da angiogênese, pode gerar várias isoformas. Destas, duas são originadas pela utilização de um sítio de *splicing* 3' alternativo no éxon 8 gerando isoformas com papéis divergentes: a forma antiangiogênica, VEGF<sub>165</sub>, e a pró-angiogênica VEGF<sub>165b</sub> (BATES *et al.*, 2002).

Grande parte da reprogramação do *splicing* alternativo que ocorre em tumores é creditada à função de proteínas SR. Proteínas desta família podem responder à sinalização de diversos oncogenes, como PI3K (BLAUSTEIN *et al.*, 2005), Ras (WEG-REMERS *et al.*, 2001) e Myc (DAS *et al.*, 2012). Estes sinais induzem modificações pós-traducionais, como metilação, acetilação e fosforilação, que por sua vez regulam o particionamento destas proteínas entre o citoplasma e o núcleo, e modulam sua atividade. Várias quinases podem promover a fosforilação de proteínas da família SR *in vitro*, como Akt, PKA e PKC (ZHOU e FU, 2013). *In vivo*, porém, os principais mediadores da fosforilação destas proteínas são as SRPKs (*SR-specific protein kinases*), que distribuem-se entre núcleo e citoplasma e também podem ser ativadas por vias de sinalização oncogênicas (GERMANN *et al.*, 2012). O alvo mais bem descrito de SRPKs em tumores é SRSF1. Esta proteína é um proto-oncogene (KARNI *et al.*, 2007) e sua superexpressão foi suficiente para transformar células epiteliais de mama, regulando a apoptose e a proliferação (ANCZUKOW *et al.*, 2012), demonstrando seu papel de induzir isoformas de *splicing* alternativo pró-tumorais.

### 3 JUSTIFICATIVA

O melanoma é o tipo de câncer de pele que mais causa mortes no mundo. Um dos fatores que o tornam tão agressivo é a elevada capacidade de invasão e metástase. Esta característica se deve, em parte, à presença de altos níveis de MMPs, enzimas que degradam a MEC. *RECKA*, um dos inibidores destas MMPs, possui sua expressão inibida pela via Ras/Raf/MEK/ERK. Esta via concentra as mutações mais frequentes encontradas em melanomas, que ocorrem em Ras e em Raf, e que tornam esta via constitutivamente ativa. Uma vez ativa, esta via promove a proliferação celular e reduz a expressão de diversos supressores tumorais, incluindo *RECK*. Apesar do envolvimento das MMPs e do forte envolvimento da via MAPK na sua patogênese do melanoma, não há estudos que caracterizem a expressão do gene *RECK* durante sua progressão ou o papel deste inibidor de MMPs neste tipo de tumor.

Além disto, transcritos alternativos do gene *RECK* foram recentemente identificados. Resultados obtidos pelo nosso grupo mostram que uma droga com efeito antitumoral provoca a redução nos níveis de um destes transcritos, *RECKB*, em linhagens de melanoma e de glioma, concomitante com a redução dose-dependente da viabilidade e retardamento do ciclo celular. Outros resultados mostram que a razão *RECKB/RECKA* é maior em linhagens de melanoma obtidas de lesões metastáticas do que em linhagens derivadas de tumores primários, o que sugere o papel pró-metastático de *RECKB*. Apesar destas observações, a regulação e as funções destes transcritos ainda não são conhecidas.

Desta forma, faz-se importante a caracterização, em melanoma, da expressão do supressor tumoral *RECKA*, já descrito para diversos outros tumores, bem como a avaliação do efeito dos transcritos *RECKA* e *RECKB* sobre a expressão gênica de marcadores de agressividade tumoral, como MMPs, além dos seus efeitos sobre os parâmetros de invasividade e potencial tumorigênico. Além disto, é importante verificar a forma como estes transcritos são regulados por vias de sinalização importantes em melanoma, como forma de identificar possíveis marcadores ou alvos moleculares que possam auxiliar no diagnóstico ou no tratamento deste tipo de tumor.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o papel do gene *RECK* em melanoma, através do estudo das funções e da regulação dos transcritos deste gene.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a expressão de *RECKA* nos estágios da formação e progressão do melanoma;
- Avaliar, os efeitos da modulação dos níveis de *RECKA* e *RECKB*, na expressão e atividade de MMPs e seus inibidores, bem como no potencial invasivo e proliferativo em modelo de melanoma;
- Identificar vias de sinalização capazes de modular a razão *RECKA/RECKB*.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 CULTIVO DE CÉLULAS

#### 5.1.1 Obtenção das Linhagens Utilizadas

Neste estudo foram utilizadas células de melanoma humano das linhagens WM35, WM1552 (melanoma primário, de crescimento radial), WM278, WM793 (melanoma primário, de crescimento vertical), WM9, WM852, WM1617 e 1205Lu (melanoma metastático) (SATYAMOORTHY *et al.*, 1997; HSU *et al.*, 2002). Estas células nos foram cedidas pelo Professor Meenhard Herlyn, do Wistar Institute (Philadelphia, PA, EUA), e enviadas ao nosso grupo pela Profa. Dra. Enilza Espreáfico, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Ribeirão Preto, SP, Brasil). A partir das linhagens WM35 e 1205Lu, foram geradas linhagens derivadas nas quais a expressão de *RECKA* e *RECKB* foram moduladas, como descrito da seção 5.2, a seguir.

#### 5.1.2 Manutenção e Preservação das Culturas

Tanto as linhagens parentais quanto as delas derivadas foram cultivadas em meio Tu, composto por quatro partes de meio MCDB 153 (BOYCE e HAM, 1983) para uma parte de meio Leibowitz-15 (L-15) (LEIBOVITZ, 1963). Ambos os componentes foram obtidos da Sigma (St. Louis, Illinois, Estados Unidos). Este meio foi suplementado com 2% de soro fetal bovino (Gibco), 5 µg/mL de insulina humana recombinante (Roche), 2 mM de CaCl<sub>2</sub> (Merck, Darmstadt, Alemanha), 100 U/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina (Sigma).

As culturas foram mantidas a 37 °C em uma atmosfera com 5% CO<sub>2</sub>. Como as células são aderentes, os repiques foram realizados utilizando uma solução 0,1% de tripsina para desprender as células. As subculturas foram realizadas quando as culturas apresentavam aproximadamente 80% da confluência. Neste estágio, os repiques foram realizados de modo a reduzir o número de células por unidade de área em aproximadamente cinco vezes (razão de repique de 1/5).

Os estoques destas linhagens foram gerados adicionando dimetilsulfóxido (DMSO) às suspensões de células até uma concentração de 10%. As células em

suspensão foram aliquotadas em tubos criogênicos e mantidas em freezer -80 °C ou em tanque de nitrogênio líquido.

### 5.1.3 Incubação com Inibidores Farmacológicos de Vias de Sinalização

Os fármacos U0126, LY294002, Triciribine, Y27632 e GF109203X foram obtidos da Sigma. O conteúdo total dos frascos foi dissolvido em DMSO estéril, de forma a obter concentrações de 10 mM dos fármacos U0126, LY294002 (SMALLEY *et al.*, 2006) e Y27632 (HATTA *et al.*, 2009), 20 mM de Triciribine (GRAVES *et al.*, 2012) e 4,5 mM de GF109203X (HATTA *et al.*, 2009). As soluções obtidas desta forma foram armazenadas a -20 °C, ao abrigo da luz.

Para a incubação,  $10^6$  células foram plaqueadas em poços de placas de seis poços e mantidas nas condições de cultivo por 24h. No momento da incubação, cada fármaco foi diluído 1000 vezes em meio de cultura Tu completo e adicionado ao poço correspondente. As células foram expostas aos fármacos por 48h.

## 5.2 GERAÇÃO DAS LINHAGENS COM EXPRESSÃO MODIFICADA DOS TRANSCRITOS DO GENE *RECK*

### 5.2.1 Obtenção dos Plasmídeos

As expressões dos transcritos *RECKA* ou *RECKB* foram silenciadas nas linhagens WM35 e 1205Lu utilizando RNA de interferência (*RNA interference* – RNAi). Para isto foi testado um painel de sequências comerciais de short hairpin RNAs (shRNAs) para a seleção da sequência mais eficiente para o silenciamento de cada transcrito de interesse. Estes shRNAs foram obtidos na forma de vetores para expressão lentiviral pLKO2.1 (Sigma). Este vetor possui um gene que confere resistência ao antibiótico puromicina, que foi utilizado para a posterior seleção das células transduzidas. Os vetores contendo cada sequência de shRNA foram nomeados como sh23, sh24, sh25 (shRECKB), sh26 (shRECKA) e sh27. Como controle foi utilizado um shRNA com sequência aleatória (shScramble) que não possui complementaridade com nenhum mRNA conhecido. As sequências são apresentadas na TABELA 1.

TABELA 1 – SEQUÊNCIAS DOS shRNA A SEREM UTILIZADOS

Abreviatura	Sequência
shScramble	CCGG <u>CCTAAGGTTAAGTCGCCCTCG</u> CTCGAGCGAGGGCGACTTAACCTTAGGTTTTTG
sh23	CCGG <u>GCTGATTAAATGACACTCATA</u> CTCGAGTATGAGTGTCATTTAATCAGCTTTTTG
sh24	CCGG <u>CGCCTCTATTAGTCCACAATT</u> CTCGAGAATTGTGGACTAATAGAGGCGTTTTTG
sh25 (shRECKB)	CCGG <u>GCGCCTCTATTAGTCCACAAT</u> CTCGAGATTGTGGACTAATAGAGGCGCTTTTTG
sh26 (shRECKA)	CCGG <u>GCATTGTTGTTCTAAAGCAAA</u> CTCGAGTTTGCTTTAGAACAAACAATGCTTTTTG
sh27	CCGG <u>GCAGATCAGTTTGTCCCTGTA</u> CTCGAGTACAGGGACAAACTGATCTGCTTTTTG

NOTA: Os nucleotídeos sublinhados compõem as sequências complementares à do mRNA alvo. sh24 e sh25 possuem sequências presentes em todos os transcritos alternativos. Os demais são complementares apenas à forma canônica.

A superexpressão do quadro aberto de leitura (*open Reading frame* – ORF) do transcrito alternativo *RECKB* foi obtida clonando a sequência amplificada desta ORF em um vetor lentiviral de superexpressão p156RRL-sinPPT-CMVIns3-IRES2-EGFP-PRE, gerando o plasmídeo chamado de pLV-RECKB. Como controle foi gerado um vetor sem nenhuma inserção no sítio de restrição. Este plasmídeo controle foi chamado de pLV-EGFP. Os plasmídeos utilizados são representados esquematicamente na FIGURA 9.

A preparação dos vetores e todo o procedimento de produção de partículas lentivirais e infecção das células foi realizado em colaboração com o grupo da Profa. Mari C. Sogayar, da Universidade de São Paulo.

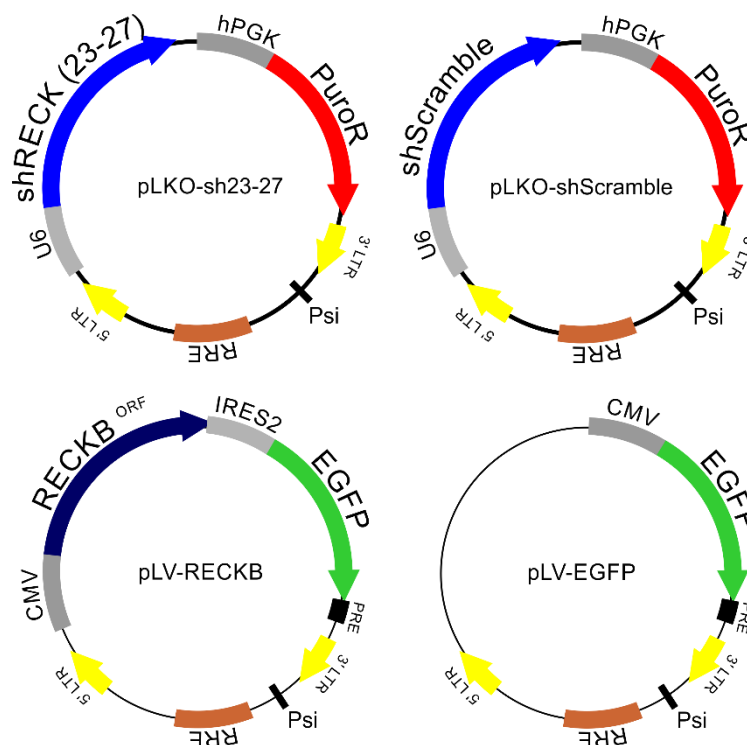


FIGURA 9 – REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DOS VETORES UTILIZADOS PARA GERAÇÃO DAS LINHAGENS COM EXPRESSÃO MODIFICADA DE *RECKA* E *RECKB*.

FONTE: O Autor

NOTA: Esquemas dos plasmídeos utilizados no silenciamento dos transcritos do gene *RECK* ou na superexpressão do quadro aberto de leitura do transcrito alternativo *RECKB*. RRE, *Rev Responsive Element*; LTR, *Long Terminal Repeats*; CMV, promotor de citomegalovirus; PGK, promotor da fosfoglicerato quinase; PuroR, gene de resistência a puromicina. EGFP, *Enhanced Green Fluorescent Protein*; IRES2, *internal ribosome entry site*; PRE, *posttranscriptional regulatory element*.

### 5.2.2 Produção das Partículas Lentivirais

As partículas lentivirais contendo os vetores para silenciamento ou superexpressão foram produzidas em células empacotadoras da linhagem HEK293T.  $10^6$  células desta linhagem foram plaqueadas em poços de placas de seis poços. Estas células foram transfectadas com os plasmídeos de interesse, juntamente com plasmídeos para a expressão das proteínas que compõem a partícula lentiviral, utilizando lipofectamine 2000 (Invitrogen). O nome, função e as quantidades de cada plasmídeo são apresentados na TABELA 2.



TABELA 2 – PRODUÇÃO DAS PARTÍCULAS LENTIVIRAIS PARA SILENCIAMENTO DE *RECKA* OU *RECKB*

Plasmídeo	Quantidade (µg)	Descrição
pMDL	0,7	Codifica as proteínas virais gag e pol.
pREV	0,3	Codifica o regulador pós-transcricional rev.
pVSVG	0,4	Codifica componentes do envelope viral, que permitem o reconhecimento de receptores em diversos tipos de células a serem infectadas.
Vetor de Interesse	1,1	Contém as sequências de shRNA ou ORF clonada para superexpressão.
DNA total por poço	2,5	

A transfecção das células HEK293T com cada vetor de interesse foi realizada incubando 2,5 µg da mistura dos plasmídeos listados na TABELA 2 com 10 µL de lipofectamine 2000 por 20 minutos em um volume final de 500 µL de meio DMEM 10% de soro HyClone. Após este período, estes 500 µL foram adicionados às células plaqueadas, em um volume final de 2 mL. Após 5h de incubação o meio de cultura foi trocado por meio fresco e as culturas foram incubadas a 37 °C em uma atmosfera de 5% CO<sub>2</sub> por 24h, período durante o qual as células condicionarão o meio de cultura com as partículas lentivirais empacotadas contendo o plasmídeo de interesse. Após o período de condicionamento, o meio de cultura foi coletado, filtrado em membrana PTFE de 0,45 µm, aliquotados em microtubos e armazenados a -80 °C. Este procedimento foi repetido mais duas vezes, adicionando-se novamente meio de cultura fresco e coletando após outras 24h, perfazendo um total de três coletas de meio condicionado para cada transfecção e empacotamento. O procedimento de produção das partículas lentivirais é representado de forma esquemática na FIGURA 10.

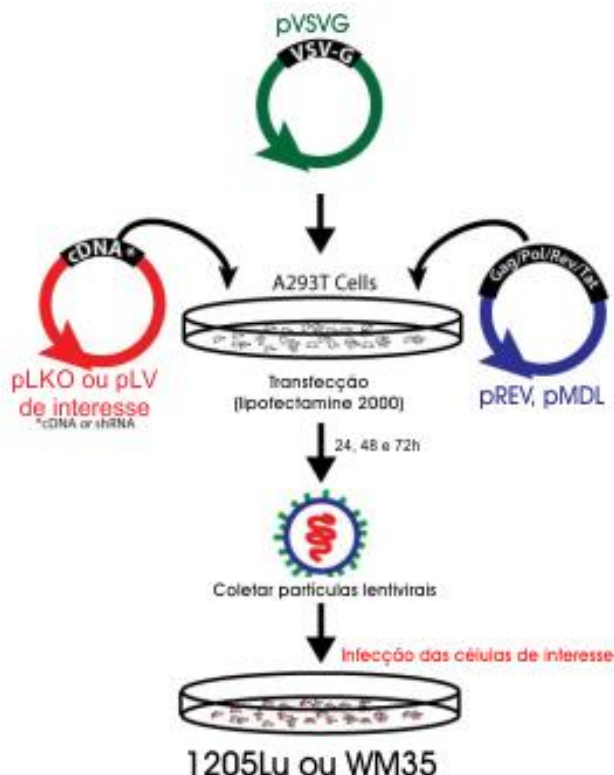


FIGURA 10 – ESQUEMA DO PROCEDIMENTO DE PRODUÇÃO DAS PARTÍCULAS LENTIVIRAIS E INFECÇÃO DAS CÉLULAS DE INTERESSE

FONTE: Adaptado de Addgene (<http://www.addgene.org/lentiviral/protocols-resources/>)

NOTA: Representação esquemática das etapas do empacotamento e coleta dos lentivirus contendo os vetores de expressão de interesse (shRECK, RECKB<sup>off</sup> ou controles) e da infecção de células das linhagens de interesse.

### 5.2.3 Determinação do Título Viral do Meio Condicionado

O título viral do *pool* das três coletas foi determinado através da quantificação de células EGFP-positivas após a incubação com diferentes diluições do meio condicionado. Para isto, foram preparadas diluições seriadas de cada meio condicionado coletado, obtendo assim suspensões 1:100, 1:1.000 e 1:10.000 em meio DMEM suplementado com 10% de soro HyClone. De posse das suspensões diluídas,  $10^5$  células da linhagem 293T foram plaqueadas em cada poço de uma placa de 6 poços, utilizando DMEM suplementado com 10% de soro fetal bovino. No dia seguinte, o meio de cultura foi trocado por 2mL/poço de DMEM suplementado com 10% de soro HyClone e 8 µg/mL de polibreno. Cada diluição foi adicionada a dois poços da placa, perfazendo um volume final de 2,5 mL em cada poço. As células expostas aos meios condicionados foram incubadas a 37 °C em atmosfera com 5% CO<sub>2</sub> por 48h, período após o qual as células EGFP-positivas foram contadas nos poços referentes à menor diluição capaz de induzir a transdução. Assim, determinou-se a unidade infectante (UI)

da suspensão de partículas lentivirais, definido aqui como o volume de meio condicionado necessário para a infecção de uma célula suscetível.

#### 5.2.4 Infecção das Células de Interesse

As células de melanoma humano das linhagens WM35 e 1205Lu foram utilizadas para gerar linhagens derivadas que superexpressam *RECKB* ou apresentam silenciamento da expressão de *RECKA* ou *RECKB*. Estas linhagens derivadas foram obtidas através da infecção de células de cada linhagem com as partículas lentivirais geradas, capazes de incorporar a sequência ORF de *RECKB* ou sequências de shRNA ao genoma da célula transduzida. Para isto,  $5 \times 10^3$  células de cada linhagem foram plaqueadas em placas de 24 poços, sendo um poço para cada modificação desejada. As células plaqueadas foram mantidas a 37 °C em atmosfera com 5% CO<sub>2</sub> por 24h. Após este período cada poço foi exposto à suspensão de partículas lentivirais na presença de 8 µg/mL de polibreno. Para a linhagem 1205Lu utilizou-se uma multiplicidade de infecção (*multiplicity of infection* – MOI) de 25 (i. e. utilizou-se 25 vezes a UI por célula plaqueada), enquanto que para a linhagem WM35 utilizou-se uma MOI de 40. Após 48h o meio contendo lentivirus foi substituído por meio Tu. As células foram mantidas em cultura até atingirem um número suficiente para a seleção das células transduzidas eficientemente.

#### 5.2.5 Seleção das Células Transduzidas e Obtenção das Linhagens Modificadas

As células transduzidas com shRNAs clonados no vetor pLKO2.1 foram selecionadas incubando as culturas com 1 µg/mL do antibiótico puomicina (Sigma) por 3 dias. As células resistentes foram expandidas até que fosse possível preparar um estoque das linhagens obtidas, mantendo o número de passagens equivalentes entre as diferentes linhagens geradas.

As linhagens transduzidas com os vetores pLV-RECKB e pLV-EGFP foram selecionadas por citometria de fluxo (FACS Aria, BD) com base na fluorescência do EGFP (*enhanced green fluorescent protein*), utilizando a função *sorting*. Após a seleção, as culturas foram expandidas e estocadas com o mesmo número de passagens.

### 5.3 QUANTIFICAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO CELULAR

As curvas de proliferação das linhagens modificadas geradas foram avaliadas por contagem em hemocitômetro de Neubauer mediante marcação com corante e exclusão azul de Trypan ou por coloração com cristal violeta.

#### 5.3.1 Contagem de Células Viáveis

A proliferação das linhagens modificadas geradas foi avaliada plaqueando  $2 \times 10^4$  células por poço em placas de 24 poços. O número de células foi determinado após o período de adesão das células ( $t=0d$ ). A partir deste, foram determinados os números de células após 1, 3, 5, 7 e 9 dias, por contagem das células em hemocitômetro de Neubauer após marcação das células não viáveis com 0,1% do corante de exclusão azul de Trypan.

#### 5.3.2 Avaliação da Proliferação Celular por Cristal Violeta

Foram plaqueadas  $2 \times 10^4$  células em placas de 24 poços. Após a adesão as células são fixadas em solução de 10% formaldeído por 5 minutos e coradas com solução de 0,05% de cristal violeta em água por 30 minutos, retirando-se a solução corante dos poços em seguida. Os poços com as células coradas foram lavados com PBSA. Em seguida, adicionou-se 1 mL de metanol absoluto a cada poço para solubilizar o corante internalizado nas células. A absorbância do cristal violeta em 540 nm foi quantificada em leitor de microplacas Epoch. Assumiu-se que a absorbância em cada poço era diretamente proporcional à quantidade de células aderidas. O procedimento foi repetido para tempos 0, 1, 3, 5, 7 e 9 dias.

### 5.4 QUANTIFICAÇÃO DE mRNA POR RT-qPCR.

#### 5.4.1 Extração de RNA Total

As células foram soltas da placa utilizando solução de tripsina. A suspensão resultante foi centrifugada a 1.000G por 5 minutos, e o sobrenadante descartado. O *pellet* resultante foi ressuspendido em PBSA e novamente centrifugado. O

sobrenadante foi cuidadosamente removido e os *pellets* foram armazenados a -80 °C até a extração.

O RNA total foi isolado utilizando o High Pure RNA Isolation Kit (Roche), seguindo as instruções do fabricante, utilizando um volume de eluição de 50 µL. O RNA isolado foi quantificado em espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo) através da absorbância em 260 nm. A contaminação por proteínas ou compostos fenólicos foi estimada pelas absorbâncias em 280 e 230 nm, respectivamente. Utilizou-se somente RNA cujas razões 260/280 e 260/230 eram maiores que 2,0. Após a quantificação, 1 µg dos RNAs extraídos de cada amostra foram submetidos à separação eletroforética em gel de agarose 1,5% em TBE (10 mM Tris-HCl, 0,1 mM EDTA e 1 mM HB). O gel foi incubado em solução de brometo de etídio por 10 minutos e observado em transiluminador sob luz ultravioleta na faixa de 300 nm. Foram utilizadas apenas as amostras que apresentavam bandas referentes às subunidades ribossomais 18S e 28S sem sinal de degradação, e que não apresentavam banda de alta massa molecular referente à contaminação com DNA genômico.

#### 5.4.2 Transcrição Reversa para Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA foi utilizado o kit ImProm II Reverse Transcriptase (Promega), seguindo as instruções do fabricante. Para isto, utilizou-se 1 µg do RNA total extraído, que foi incubado com *primer* Oligo(dT)<sub>15</sub>, para transcrição reversa apenas de RNAs mensageiros (*Messenger RNA* – mRNA). Para a transcrição reversa foi utilizada uma concentração de 150 mM MgCl<sub>2</sub> (3 µL da solução contida no kit por reação). Os cDNA sintetizados foram diluídos 10 vezes e armazenados a -20 °C.

#### 5.4.3 Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR)

A qPCR foi realizada em um termociclador StepOne Plus (Life Technologies), utilizando o kit SYBR Green Master Mix (Life Technologies), utilizando *primers* específicos para o transcrito que se deseja quantificar (Life Technologies), cujo desenho é descrito no item a seguir. Cada reação foi preparada para um volume final de 12 µL, dos quais 3 µL correspondiam à amostra de cDNA obtida como descrito no item 5.4.2. O programa utilizado para variação de temperatura foi o padrão do equipamento (10 minutos a 95 °C; 40 ciclos de 15 s a 95 °C e 1 minuto a 60 °C; 1

minuto a 95 °C e; rampa de temperatura de 60 a 95 °C, com incrementos de 0,3 °C). Cada quantificação foi feita em duplicata. Em cada corrida foi realizada uma reação controle para cada gene testado, utilizando água ultrapura autoclavada no lugar da amostra. Corridas nas quais houve amplificações nos controles negativos ocorreram com menos de 7 ciclos de diferença da amostra com maior valor de  $C_T$  foram desconsideradas. Após o término da reação, os valores de  $C_T$  médios de cada quantificação foram tabelados. A normalização dos dados foi feita como descrito na literatura (VANDESOMPELE *et al.*, 2002), através da ferramenta GeNorm 3.4, levando em conta a eficiência de amplificação de cada par de *primers* ( $E$ ) e utilizando a expressão dos genes *GAPDH*, *HPRT* e *HMBS* como referência.

#### 5.4.3.1 Desenho, validação e determinação dos parâmetros dos *primers* utilizados

Os *primers* foram desenhados atendendo a critérios de alta especificidade e formação mínima de estruturas secundárias, homo ou heterodímeros (BUSTIN *et al.*, 2009), respeitando os limites de temperatura de anelamento e tamanho do amplicom para manter a compatibilidade com o programa padrão do equipamento.

O Primer-BLAST (disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) foi utilizado para encontrar pares de *primers* específicos para o mRNA de interesse. A ferramenta foi configurada para retornar pares candidatos que possuísem uma temperatura de anelamento (*melting temperature* -  $T_m$ ) de  $60 \pm 2$  °C, de modo que a diferença das  $T_m$  do *Forward primer* e do *Reverse primer* fossem menores que 3 °C. Além disto, os resultados foram restritos apenas aos pares cujos *primers* estivessem separados por um íntron na sequência genômica correspondente ou que estivessem sobrepostos à junção entre dois éxons no mRNA maduro. As sequências *forward* e *reverse* dos pares retornados foram testadas quanto à formação de estruturas secundárias (i. e. grampos e/ou dímeros) utilizando a ferramenta OligoAnalyzer, (disponível em <http://www.idtdna.com/analyzer/applications/oligoanalyzer/>). Os *primers* que atenderam aos critérios foram adquiridos e diluídos em água ultrapura autoclavada.

As sequências dos *primers* e a concentração utilizada de cada par são apresentados na TABELA 3.

TABELA 3 – SEQUÊNCIAS E CONCENTRAÇÕES DOS PRIMERS UTILIZADOS NOS ENSAIOS DE qPCR

Gene	Concentração	Sentido	Sequência (5' – 3')
<i>hRECKA</i>	150 nM	Forward:	TGGAAAGCAATAGCTTGTTCACT
		Reverse:	CTTTCAGCTGTGTGGTCTTCAG
<i>hRECKB</i>	600 nM	Forward:	TATTGCGCCTCTATTAGTCCACAA
		Reverse:	CAGCTTCATCAGGAGGCCTATC
<i>hRECKD</i>	600 nM	Forward:	AATGAGGAACCCAACGGATATGT
		Reverse:	TCAGGCTCTCTTCTCATTGTTATGACT
<i>hMMP2</i>	600 nM	Forward:	AGCTCCCGGAAAAGATTGATG
		Reverse:	CAGGGTGCTGGCTGAGTAGAT
<i>hMMP9</i>	150 nM	Forward:	CCTGGAGACCTGAGAACCAATC
		Reverse:	GATTTCGACTCTCCACGCATCT
<i>hMT1MMP</i>	150 nM	Forward:	CCATGCAGAAGTTTTACGGCT
		Reverse:	CCCAAACCTTGCTCTGGAACACC
<i>hTIMP1</i>	400 nM	Forward:	CCGCAGCGAGGAGTTTCTC
		Reverse:	GAGCTAAGCTCAGGCTGTTCCA
<i>hTIMP2</i>	600 nM	Forward:	CGACATTTATGGCAACCCTATCA
		Reverse:	GCCGTGTAGATAAACTCTATATCC
<i>hTIMP3</i>	800 nM	Forward:	ATCGGTATCACCTGGGTTGT
		Reverse:	CGGTCCAGAGACACTCGTTC
<i>hGAPDH</i>	600 nM	Forward:	ACCCACTCCTCCACCTTTGA
		Reverse:	CTGTTGCTGTAGCCAAATTCGT
<i>hHPRT</i>	150 nM	Forward:	GAACGTCTTGCTCGAGATGTGA
		Reverse:	TCCAGCAGGTCAGCAAAGAAT
<i>hHMBS</i>	150 nM	Forward:	TGGACCTGGTTGTTCACTCCTT
		Reverse:	CAACAGCATCATGAGGGTTTTTC

A concentração ótima de cada par de *primers* foi determinada testando concentrações finais de 200, 400, 600 e 800 nM nas reações de qPCR utilizando um *pool* de amostras como molde. Foram utilizadas as menores concentrações que não limitassem a reação, como observado pelo formato das curvas de fluorescência em relação aos ciclos da reação. As curvas de dissociação de todos os pares de *primers* utilizados apresentaram somente picos únicos.

A eficiência de amplificação de cada par de *primers* ( $E$ ) foram determinadas plotando os valores de  $C_T$  para várias diluições seriadas de um *pool* de amostras (i. e. 1:10, 1:20, 1:40, 1:80 e 1:160), de forma a obter o coeficiente angular,  $a$ , da curva  $C_T$  versus  $-\log[\text{pool}]$ . A eficiência de amplificação é determinada pela relação  $E = 10^{\frac{-1}{a}}$ .

## 5.5 WESTERN BLOTTING

### 5.5.1 Lise das Células e Quantificação de Proteínas

$2,1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> de cada linhagem gerada foram plaqueadas e incubadas a 37 °C em atmosfera com 5% CO<sub>2</sub> por 48h. As células então foram soltas com solução de tripsina, transferidas para microtubos e centrifugadas a 1.000G por 5 minutos. Após o descarte do sobrenadante, o *pellet* foi ressuspenso em PBSA e novamente centrifugado nas mesmas condições. O *pellet* resultante foi armazenado a -80 °C até a lise.

A lise das células para extração de proteínas totais foi feita adicionando aos *pellets* 500 µL de tampão RIPA<sup>+</sup> gelado (10 mM Tris-HCl pH 7,5; 1% desoxicolato de sódio; 1% Triton X-100; 150 mM NaCl; 0,1% SDS) suplementado com coquetel de inibidores de proteases (Sigma) e com os inibidores de fosfatases Na<sub>4</sub>P<sub>2</sub>O<sub>7</sub>, Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> e β-glicerofosfato. Após a adição os tubos foram homogeneizados em vortex e mantidos em banho de gelo (4 °C) por 30 minutos. Os lisados obtidos foram centrifugados a 15.000G por 10 minutos sob refrigeração (4 °C) e o sobrenadante foi transferido para um novo tubo. As proteínas do lisado foram quantificadas utilizando o reativo de Bradford (0,01% Coomassie Brilliant Blue G-250; 5% etanol; 8,5% ácido fosfórico).

### 5.5.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) e Transferência

50 µg de proteínas foram misturadas com tampão de amostra redutor (concentrações finais de 50 mM Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 10% glicerol; 5% β-mercaptoetanol e; 0,1% azul de bromofenol), fervidas por 10 minutos e separadas por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecilsulfato de sódio (SDS) (SDS-PAGE), utilizando tampão de corrida Tris-Glicina (25 mM Tris-HCl pH 8,3; 250 mM Glicina; 0,1% SDS) (LAEMMLI, 1970). Para a separação foi aplicada uma diferença



de potencial de 100V, o que representava, em média, 20 mA por gel de 1 mm de espessura. A eletroforese foi conduzida até que o azul de bromofenol atingisse a extremidade inferior do gel.

Após a separação as proteínas foram transferidas para membranas de nitrocelulose utilizando tampão de transferência (48 mM Tris-HCl; 39 mM Glicina; 0,037% SDS e; 20% Metanol) (TOWBIN *et al.*, 1979). A transferência foi conduzida por 3h em cuba de transferência úmida com uma corrente de 300 mA. A transferência das proteínas do gel para a membrana de nitrocelulose foi confirmada pela coloração do gel após a transferência com 0,5% Coomassie R-250 (em água:metanol:ácido acético 60:30:10) e com a coloração da membrana, com o corante solúvel de Ponceau.

### 5.5.3 Marcação com Anticorpos, Revelação e Quantificação

Após a confirmação da transferência a membrana foi lavada com TBST (50 mM Tris-HCl pH 7,5; 150 mM NaCl; 0,1% Tween-20) até a total remoção do corante Ponceau e incubada por 1h em solução de bloqueio (5% BSA em TBST). A membrana bloqueada foi, então, incubada *overnight* com uma solução do anticorpo primário de interesse em solução de bloqueio. Ao término da incubação a membrana passou por quatro lavagens de 10 minutos com TBST para remoção dos anticorpos não ligados ou com ligações não específicas mais fracas. A membrana com os anticorpos primários ligados foi incubada por 1h com uma solução do anticorpo secundário conjugado com peroxidase e lavada quatro vezes por 10 minutos com TBST. Os anticorpos utilizados foram Rabbit Anti-RECK (cujo imunógeno consiste nos motivos Kazal de RECKA humano e, portanto, não reconhece as isoformas) (1:1.000) (Cell Signaling), Rabbit anti p-p42/44<sup>MAPK</sup> (p-ERK1/2) (1:1.000), Rabbit anti p42/44<sup>MAPK</sup> (ERK1/2), Rabbit Anti-GAPDH (1:10.000) (Sigma) e Goat Anti-Rabbit IgG Conjugado com peroxidase (1:10.000) (Sigma).

A revelação dos *blots* foi realizada incubando a membrana, já marcada com anticorpo secundário, com um substrato quimioluminescente da peroxidase (SuperSignal West Pico, da Thermo Scientific), de acordo com as instruções do fabricante. A luminescência foi detectada pela exposição de filmes de autorradiografia (Amersham Hyperfilm ECL, da GE) à membrana, em sala escura, por diferentes

tempos (entre 2 e 30 minutos), a fim de atingir uma exposição ideal do filme sem que houvesse saturação.

## 5.6 ZIMOGRRAFIA EM GELATINA

$2,1 \times 10^4$  células/cm<sup>2</sup> de cada linhagem gerada foram plaqueadas em substrato plástico ou em placas revestidas com matrigel® (BD) e incubadas a 37 °C em atmosfera com 5% CO<sub>2</sub> por 24h na presença de meio Tu suplementado como descrito no item 5.1.2. Após este período, o meio de cultura foi removido e substituído por meio Tu sem soro fetal bovino e suplementado com 0,1% de BSA, no qual as células foram mantidas por 72h. O meio condicionado foi coletado e mantido em banho de gelo, enquanto as células aderidas foram contadas para normalização.

Um volume de aproximadamente 20 µL do meio condicionado (ajustado para cada amostra de acordo com o número de células aderidas no momento da coleta) foi misturado com tampão de amostra não-redutor (concentrações finais de 50 mM Tris-HCl pH 6,8; 2% SDS; 10% glicerol e; 0,1% azul de bromofenol) e aplicados em um gel SDS-PAGE contendo 10% de acrilamida, co-polimerizada com 1 mg/mL de gelatina (EIA Reagent Grade, Bio-Rad). A eletroforese foi conduzida utilizando tampão tris-glicina como descrito no item 5.5.2. Ao término da eletroforese o gel passou por duas lavagens de 15 minutos em solução de 2,5% Triton X-100 e então foi incubado *overnight* em tampão de reação (50 mM Tris-HCl pH 8,0; 10 mM CaCl<sub>2</sub>; 1 µM ZnSO<sub>4</sub>) a 37 °C.

Após o tempo de reação, o gel foi corado com 0,5% Coomassie R-250 (em água:metanol:ácido acético 60:30:10). O gel foi digitalizado e a intensidade das bandas correspondentes às MMPs foram quantificadas utilizando o software ImageJ.

## 5.7 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE INVASIVA

$2,5 \times 10^4$  células suspensas em meio de cultura MCDB/L-15 (4:1) sem suplementação foram transferidas para câmaras de Boyden (Transwell, BD) com insertos de poros de 8 µm, revestidas com Matrigel® (BD), seguindo instruções do fabricante. No compartimento inferior foi utilizado meio Tu contendo 50% de soro fetal bovino como quimioatratador. A placa contendo os Transwells® foi incubada a 37 °C em atmosfera com 5% CO<sub>2</sub> por 48h. Após este período o matrigel®, juntamente com

as células não invasivas, foi removido do compartimento superior utilizando cotonetes, restando apenas as células que atravessaram o poro de 8  $\mu\text{m}$  e chegaram à superfície inferior do inserto. As células invasivas foram fixadas por 5 minutos em 10% formaldeído e em seguida coradas por 30 minutos com cristal violeta 0,05%. A superfície inferior do inserto foi inspecionada em microscópio invertido para registro em micrografia. Após lavagem exaustiva com água para remoção do cristal violeta não internalizado pelas células, o cristal violeta nas células foi eluído com metanol absoluto. A capacidade invasiva foi quantificada através da absorbância do cristal violeta eluído em 540 nm, medida em leitor de microplacas Epoch.

## 5.8 DETERMINAÇÃO DA CAPACIDADE DE PROLIFERAÇÃO LIVRE DE ADESÃO

Placas de 24 poços foram revestidas com 0,5 mL de agarose 0,6% dissolvida em meio DME suplementado com 10% de soro fetal bovino. Sobre este revestimento foram plaqueadas  $10^4$  células, suspensas em 1 mL de uma solução de agarose 0,3% também dissolvida em meio DME com 10% SFB (FREEDMAN e SHIN, 1974). Após a gelificação adicionou-se 0,5 mL de meio Tu aos poços e a placa foi incubada a 37 °C em uma atmosfera com 5%  $\text{CO}_2$  por 21 dias, trocando o meio Tu por meio fresco a cada 3 dias. O experimento é ilustrado de forma esquemática na FIGURA 11.

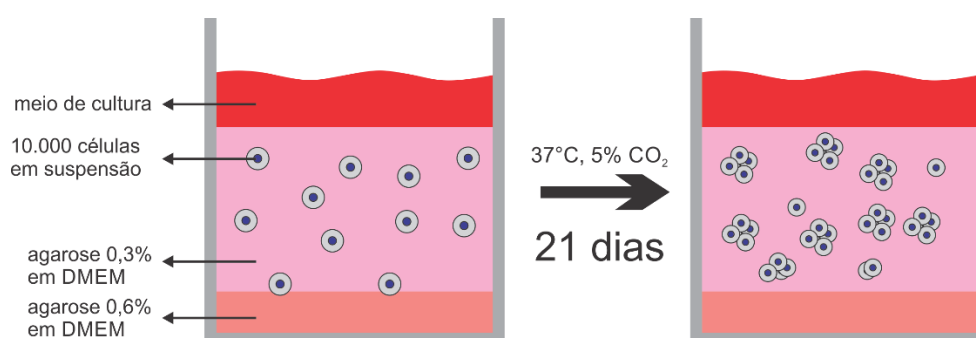


FIGURA 11 – ESQUEMA DO ENSAIO DE DETERMINAÇÃO DA PROLIFERAÇÃO LIVRE DE ADESÃO  
 FONTE: O Autor

NOTA: Representação do conteúdo esperado dos poços no início e ao final do ensaio.

Foram fotografados 10 campos de cada poço em microscópio invertido (Axiovert 40, Zeiss) e o número de colônias em cada campo foi contado utilizando o software ImageJ.

## 5.9 SELEÇÃO E ANÁLISE DE DADOS DE EXPRESSÃO DEPOSITADOS

### 5.9.1 Análise de Dados de Microarranjos

Dados de expressão gênica depositados no banco de dados *Gene Expression Omnibus* (GEO) foram selecionados de acordo com o número e a origem das amostras, e de acordo com a plataforma utilizada para a quantificação da expressão. Para as análises de dados de microarranjos, os valores brutos de fluorescência referentes às sondas que representam os genes de interesse foram normalizados pelo valor médio entre as amostras. As sondas correspondentes a cada gene utilizado são listadas na TABELA 4.

TABELA 4 – SONDAS CORRESPONDENTES A CADA GENE ANALISADO EM CONJUNTOS DE DADOS DE MICROARRANJOS

Gene	Sonda*	Comentários
<i>RECK</i>	205407_at	Alinha em regiões específicas para o transcrito canônico, <i>RECKA</i> .
<i>TIMP1</i>	201666_at	-
<i>TIMP2</i>	203167_at	-
<i>TIMP3</i>	201150_s_at	-
<i>MMP2</i>	201069_at	-
<i>MMP9</i>	203936_2_at	-
<i>MMP14</i>	202828_s_at	Codifica MT1-MMP.
<i>SRSF1</i>	201742_x_at	-

NOTA: \*Sondas presentes na plataforma Affymetrix Human Genome U133A

Os dados normalizados foram utilizados para construir *heatmaps* e realizar as análises de *hierarchical clustering* não-supervisionado, utilizando o software Multi Experiment Viewer 4.8.0 (SAEED *et al.*, 2003), disponível para *download* em <http://www.tm4.org/mev.html>. A determinação dos *clusters* foi baseada na correlação de Pearson marcando a opção *complete linkage* nas configurações da análise.

### 5.9.2 Análise de Dados de RNA-Seq

Neste trabalho, foram utilizados dados de sequenciamento de RNA (RNA-Seq) depositados no banco de dados *Sequence Read Archives* (SRA). O estudo selecionado para nossas análises foi conduzido por Saltzman (2011). Neste estudo, células de câncer cervical da linhagem HeLa foram incubadas com siRNA contra o regulador de *splicing* SRSF1 ou com um siRNA sem alvo, utilizado como controle. O sequenciamento da condição controle gerou *reads* do tipo *pair ended*, e foi realizado a partir de três experimentos independentes. Já o sequenciamento da condição siSRSF1 foi realizado em cinco experimentos independentes, cada um gerando *reads* do tipo *single ended* (SALTZMAN *et al.*, 2011).

Os arquivos depositados, que continham os fragmentos sequenciados no formato .fastq, foram transferidos para o servidor da plataforma Galaxy (BLANKENBERG *et al.*, 2010b) e convertidos ao formato padrão da plataforma utilizando o módulo de software Fastq Groomer (BLANKENBERG *et al.*, 2010a). Os *reads* de todas as replicatas biológicas de cada condição a ser comparada foram combinados para as análises seguintes, gerando um único arquivo .fastq para a condição controle e outro arquivo .fastq único para a condição siSRSF1. Os arquivos de saída foram utilizados como *input* no software Tophat 2.0 (TRAPNELL *et al.*, 2009), que mapeou os *reads* e construiu os transcritos com base nas sequências alinhadas ao genoma de referência hg\_g1k\_v37 Full, permitindo 0 erros de pareamento (*mismatches*) e apenas um mapeamento por *read*, e sem permitir a montagem de transcritos alternativos novos (não presentes na anotação de referência Ensemble r67). O arquivo gerado contendo os *reads* mapeados no formato .bam, foi utilizado como *input* para a ferramenta Cufflinks, que quantifica o número de *reads* associados a cada transcrito e retorna o número de fragmentos por kb de transcrito por milhão de *reads* mapeados (*Fragments Per Kilobase of transcript per Million mapped reads* – FPKM), proporcional à expressão absoluta daquele transcrito na amostra (TRAPNELL *et al.*, 2010).

## 6 RESULTADOS

### 6.1 EXPRESSÃO DE *RECKA*, *MMPs* E *TIMPs* EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE MELANOMA HUMANO

A expressão de *MMPs* já é bastante conhecida como sendo importante para a progressão do melanoma. A expressão de *RECK*, um supressor tumoral inibidor de *MMPs*, é silenciada no estabelecimento de diversos tipos de tumores, e tumores que mantêm níveis de expressão mais elevados deste gene apresentam melhor prognóstico (NODA e TAKAHASHI, 2007). Apesar de um estudo anterior ter verificado que amostras de melanoma não apresentavam metilação no promotor do gene *RECK* (LIU *et al.*, 2008b), a expressão do transcrito *RECKA* não havia sido descrita. Para preencher esta lacuna, a expressão de genes que codificam *MMPs* (*MMP2*, *MMP9* e *MMP14*), assim como a expressão de inibidores destas *MMPs*, *TIMP1*, *TIMP2*, *TIMP3* e *RECKA*, foi analisada em painéis de dados de microarranjos depositados no banco de dados GEO. Estes painéis foram selecionados de acordo com a plataforma utilizada (Affymetrix Human Genome U133A), o número de amostras clínicas analisadas e os estágios de progressão representados por estas amostras. Desta forma, foram selecionados dois conjuntos de dados que representam a) os estágios iniciais da transformação, incluindo amostras de pele normal, *nevi* benigno e melanoma maligno (TALANTOV *et al.*, 2005) (número de acesso no GEO: GDS1375) e b) a progressão de lesão primária para metástases (XU *et al.*, 2008) (número de acesso no GEO: GDS3966). Os valores de expressão de cada gene foram obtidos a partir das leituras registradas de cada sonda correspondente. As sondas referentes a cada gene são listadas na TABELA 4.

#### 6.1.1 Alterações nos Perfis de Expressão de *MMPs* e Seus Inibidores nos Estágios Iniciais da Transformação do Melanócito

O estudo conduzido por Talantov *et al.* (2005) comparou os transcriptomas de 7 amostras de tecido normal, 18 amostras de *nevi* benignos e 45 amostras de melanoma maligno para verificar quais genes estão relacionados à transformação maligna. A publicação original, porém, não menciona a expressão de *MMPs* e seus inibidores. De posse dos dados brutos depositados pelo autor no banco de dados, nossa análise foi realizada selecionando somente valores de expressão referentes a

este subconjunto de genes. Inicialmente, para verificar a associação destes genes com a transformação maligna do melanócito, os perfis de expressão no painel de amostras foram submetidos à análise de *hierarchical clustering* não supervisionado, no qual as amostras e os genes são agrupados de acordo com a semelhança entre os perfis, determinada pelo coeficiente de correlação de Pearson. A FIGURA 12 mostra o *heatmap* gerado a partir dos valores de expressão normalizados e os dendrogramas derivados do *hierarchical clustering*. Observou-se que os perfis de expressão de MMPs e seus inibidores foram suficientes para classificar as amostras de acordo com o tipo de tecido de origem, agrupando amostras de mesmo tipo nos mesmos *clusters* de forma eficiente, com poucas classificações errôneas (4 em 70). Esta eficiência foi semelhante à obtida pelos autores utilizando um conjunto muito maior de genes (TALANTOV *et al.*, 2005).

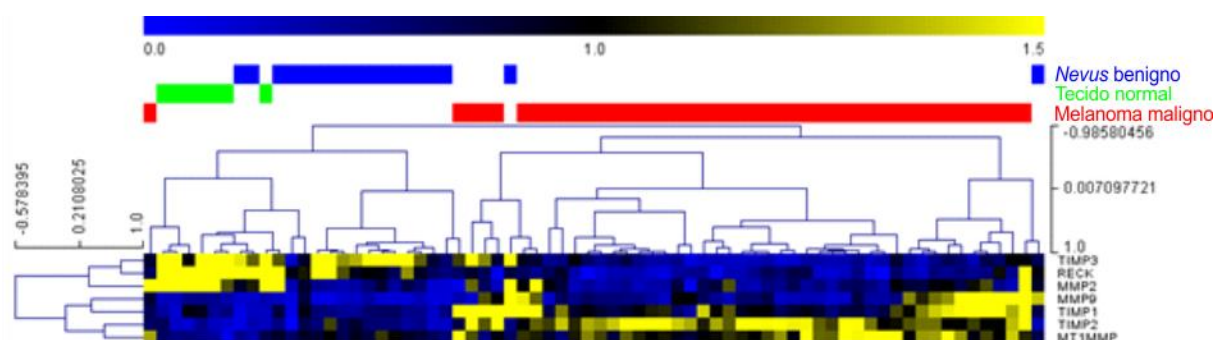


FIGURA 12 – HEATMAP DA EXPRESSÃO DE MMPs E SEUS INIBIDORES EM AMOSTRAS DE TECIDOS NORMAIS, NEVI BENIGNOS E MELANOMA MALIGNO

FONTE: Jacomasso *et al.*, 2014

NOTA: No *heatmap* cada coluna representa uma amostra utilizada no estudo (TALANTOV *et al.*, 2005). A cada amostra foi designada uma cor, de acordo com sua origem (verde para tecidos normais, azul para *nevi* benignos e vermelho para melanoma maligno). As linhas representam os genes cujos valores de expressão foram analisados. A representação é feita em uma escala de cores que vai de azul brilhante (baixa expressão) até amarelo brilhante (alta expressão), passando pelo preto (expressão próxima à média), como representado na escala na parte superior da figura (valor médio = 1,0). Os dendrogramas que interligam as amostras ou os genes foram gerados com base no coeficiente de correlação de Pearson, representado nas escalas.

Os dendrogramas originados das correlações entre os genes mostram *RECKA* e *TIMP3* agrupados em um mesmo ramo com coeficiente de correlação de Pearson bastante alto e de sinal positivo, o que indica uma tendência de que a expressão destes genes variem de forma similar neste conjunto de amostras. O mesmo é observado para *MMP14* (*MT1MMP*) e *TIMP2*. Estes dois pares de genes estão em ramos opostos, o que indica uma correlação inversa. A significância destas

correlações foi verificada determinando-se o valor do coeficiente “r” de correlação de Spearman e testando estatisticamente a distribuição dos valores.

Os resultados apresentados na FIGURA 13 mostram que as correlações diretas entre *RECKA* e *TIMP3*, *MT1MMP* e *TIMP2* são estatisticamente significativas, assim como a correlação inversa entre *RECKA* e *MT1MMP*. Este dado sugere a regulação concomitante destes genes.

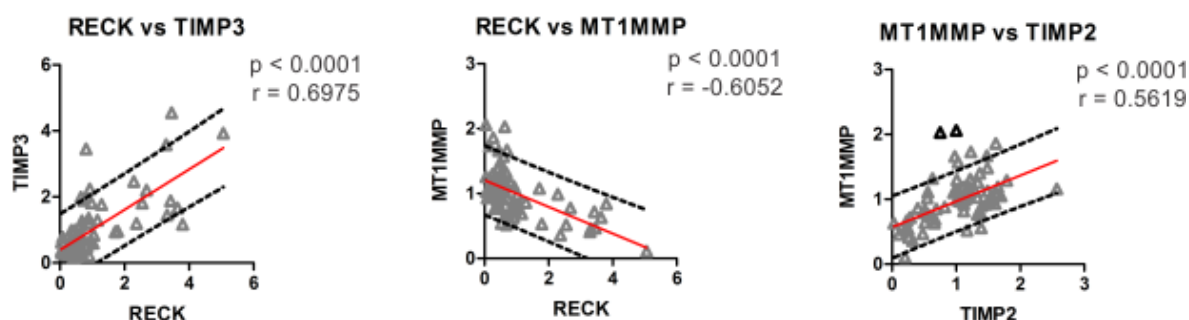


FIGURA 13 – COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO DE SPEARMAN (“r”) ENTRE OS PERFIS DE EXPRESSÃO DE *RECKA*, *TIMP3*, *MT1MMP* E *TIMP2*.

FONTE: Jacomasso *et al.*, 2014

NOTA: Em cada gráfico, a linha vermelha representa a melhor função linear que pode ser associada com a distribuição dos dados. Os delimitadores tracejados representam o intervalo de confiança de 95%, e os pontos com contorno preto são considerados como *outliers*. O teste estatístico consiste em determinar se a inclinação da reta é estatisticamente diferente de zero. Valores de  $p < 0,05$  são considerados significativos. O valor de r pode variar de -1 (correlação total inversa) a +1 (correlação total direta).

Para verificar se os níveis de expressão de *RECKA*, *TIMP2*, *TIMP3* e *MT1MMP* são alterados significativamente durante a transformação maligna, foram comparados os valores medianos de expressão de cada gene, agrupando as amostras de acordo com o estágio da lesão de origem (tecidos normais, em *nevi* benignos e em melanomas malignos). Os resultados são apresentados na FIGURA 14.

Observa-se a redução significativa da expressão mediana de *RECKA* em melanoma maligno, quando comparado com amostras de tecidos normais ou displasias benignas. Esta redução é acompanhada de redução da expressão de *TIMP3*. Além disto, as lesões malignas possuem níveis significativamente maiores dos transcritos de *TIMP2* e *MT1MMP* do que tecidos normais e *nevi* benignos.



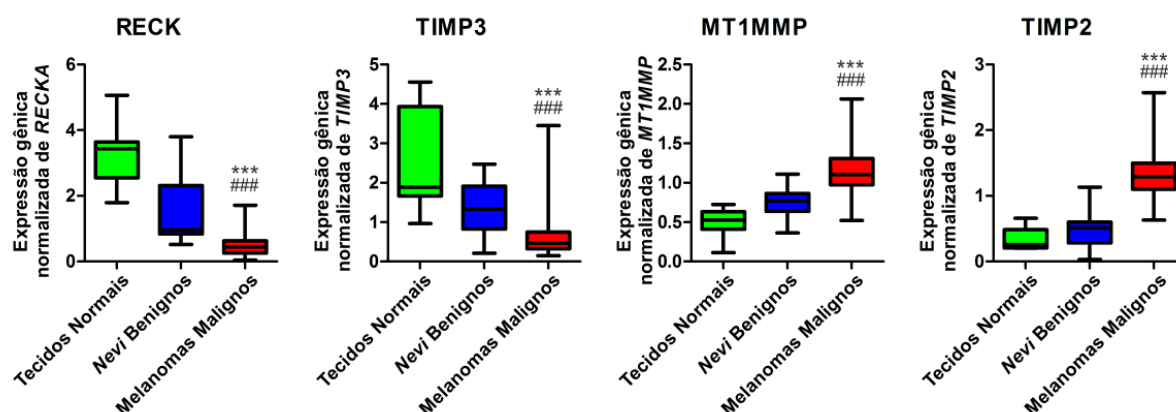


FIGURA 14 – MODULAÇÃO DOS NÍVEIS DE *RECKA*, *TIMP3*, *MT1MMP* E *TIMP2* NA TRANSFORMAÇÃO MALIGNA DO MELANÓCITO  
 FONTE: Jacomasso *et al.*, 2014

NOTA: Os gráficos representam as distribuições dos valores de expressão normalizados para cada grupo de amostras (verde para tecidos normais, azul para *nevi* benignos e vermelho para melanomas malignos). As caixas indicam o intervalo entre o segundo e o terceiro quartis (25º e 75º percentis), e as barras indicam os valores máximos e mínimos de cada grupo. As linhas dentro das caixas representam os valores medianos de expressão. As medianas foram comparadas utilizando o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não-paramétrico). \*\*\*,  $p < 0,001$  em relação aos tecidos normais. ####,  $p < 0,001$  em relação aos *nevi* benignos.

Em resumo, a análise da expressão de genes que codificam MMPs, TIMPs e RECK neste conjunto de dados de microarranjo revela que o estabelecimento do melanoma maligno está relacionado com a alteração do perfil de expressão destes genes, alteração esta que pode ser utilizada para diferenciar amostras de *nevi* benignos de melanoma maligno. Além disto, o estabelecimento do melanoma é acompanhado da redução da expressão de *RECKA*, um gene supressor tumoral que é silenciado em diversas outras neoplasias, e no aumento da expressão de genes relacionados a agressividade de tumores, como *MT1MMP* e *TIMP2*.

#### 6.1.2 Alterações nos Perfis de Expressão de MMPs e seus Inibidores na Progressão de Melanoma Primário para Melanoma Metastático

O estudo publicado por Xu *et al.* (2008) reuniu dados de microarranjo de 31 amostras clínicas de melanomas primários e 53 amostras de melanomas metastáticos, com o objetivo de identificar genes envolvidos na progressão da doença. Partindo dos dados depositados no GEO, foram analisadas as expressões de *MMP2*, *MMP9*, *MMP14* (*MT1MMP*), *TIMP1*, *TIMP2*, *TIMP3* e *RECKA*, como no item 6.1.1, de forma a verificar as alterações que ocorrem após a metástase. Para isto, os dados de expressão obtidos foram organizados na forma de *heatmap* e submetidos à análise

de *hierarchical clustering*, como apresentado na FIGURA 15. Observou-se que os dados referentes à este subconjunto de genes não foram suficientes para agrupar as amostras de acordo com o estágio da progressão (melanoma primário ou metastático) de forma tão eficiente quanto observado na análise descrita no item 6.1.1.

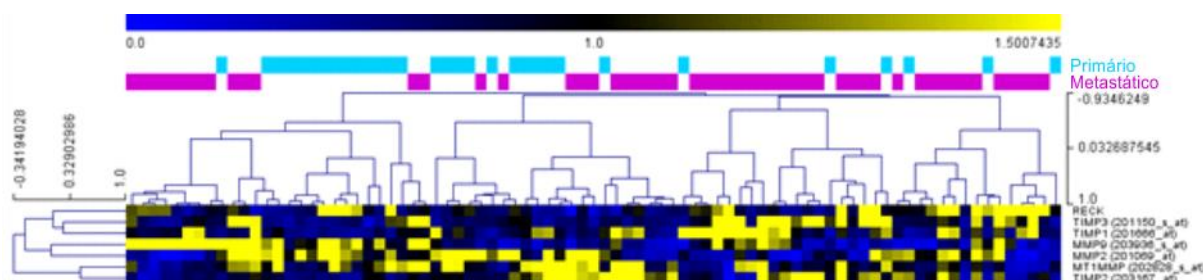


FIGURA 15 – HEATMAP DA EXPRESSÃO DE MMPs E SEUS INIBIDORES EM AMOSTRAS DE MELANOMA PRIMÁRIO E MELANOMA METASTÁTICO

FONTE: Jacomasso *et al.*, 2014

NOTA: No *heatmap* cada coluna representa uma amostra utilizada no estudo (XU *et al.*, 2008). A cada amostra foi designada uma cor, de acordo com sua origem (azul claro para melanomas primários e roxo para melanomas metastáticos). As linhas representam os genes cujos valores de expressão foram analisados. A representação é feita em uma escala de cores que vai de azul brilhante (baixa expressão) até amarelo brilhante (alta expressão), passando pelo preto (expressão próxima à média), como representado na escala na parte superior da figura (valor médio = 1,0). Os dendrogramas que interligam as amostras ou os genes foram gerados com base no coeficiente de correlação de Pearson, representado nas escalas.

Apesar da homogeneidade entre melanomas primários e metastáticos no que diz respeito a expressão dos genes analisados e da falha em classificá-los corretamente de acordo com o tipo das lesões de origem, os dendrogramas de correlação entre os genes neste conjunto de dados compartilham algumas semelhanças com os da FIGURA 12, como o agrupamento de *RECKA* e *TIMP3* no mesmo *cluster*, inversamente correlacionado ao *cluster* onde foram agrupados *MT1MMP* e *TIMP2*. Estas correlações foram confirmadas como sendo estatisticamente significativas através da determinação do coeficiente “r” de Spearman (FIGURA 16). É interessante ressaltar a consistência das correlações entre *RECKA*, *TIMP3*, *MT1MMP* e *TIMP2* observadas, que apresentaram as mesmas características nas amostras reunidas e analisadas de forma independente por Talantov *et al.* (2005), como apresentado na FIGURA 13.

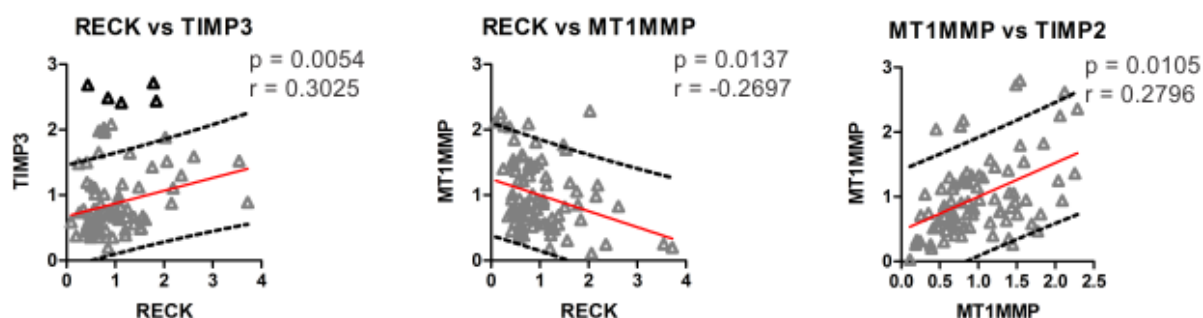


FIGURA 16 – COEFICIENTES DE CORRELAÇÃO DE SPEARMAN (“r”) ENTRE OS PERFIS DE EXPRESSÃO DE *RECKA*, *TIMP3*, *MT1MMP* E *TIMP2*.

FONTE: Jacomasso *et al.*, 2014

NOTA: Em cada gráfico, a linha vermelha representa a melhor função linear que pode ser associada com a distribuição dos dados. Os delimitadores tracejados representam o intervalo de confiança de 95%, e os pontos com contorno preto são considerados como *outliers*. O teste estatístico consiste em determinar se a inclinação da reta é estatisticamente diferente de zero. Valores de  $p < 0,05$  são considerados significativos. O valor de  $r$  pode variar de -1 (correlação total inversa) a +1 (correlação total direta).

Por fim, as distribuições dos valores de expressão de *RECKA*, *TIMP3*, *MT1MMP* e *TIMP2* foram comparadas entre os dois grupos de amostras analisados: melanomas primários e melanomas metastáticos. Os resultados são mostrados na FIGURA 17. Observamos que a mediana dos níveis de *RECKA*, *MT1MMP* e *TIMP2* não são significativamente diferentes nos dois grupos de amostra. A expressão de *TIMP3*, por outro lado, é significativamente maior em amostras derivadas de lesões metastáticas.

Considerando os dados expostos, o perfil de expressão de genes que codificam MMPs e seus inibidores não é modulado de forma significativa nos estágios de progressão do melanoma. Apesar disto, as correlações entre os níveis dos transcritos *RECKA*, *TIMP3*, *MT1MMP* e *TIMP2* neste conjunto de amostras foram consistentes com as observadas no painel analisado no item 6.1.1 (FIGURA 13), evidenciando a interação entre estes genes. Assim, a modulação de *RECKA* parece estar relacionada a modulação de *TIMP3*, *MT1MMP* e *TIMP2*, mas é restrita aos estágios iniciais do desenvolvimento do melanoma, mantendo níveis residuais estáveis durante a metástase.

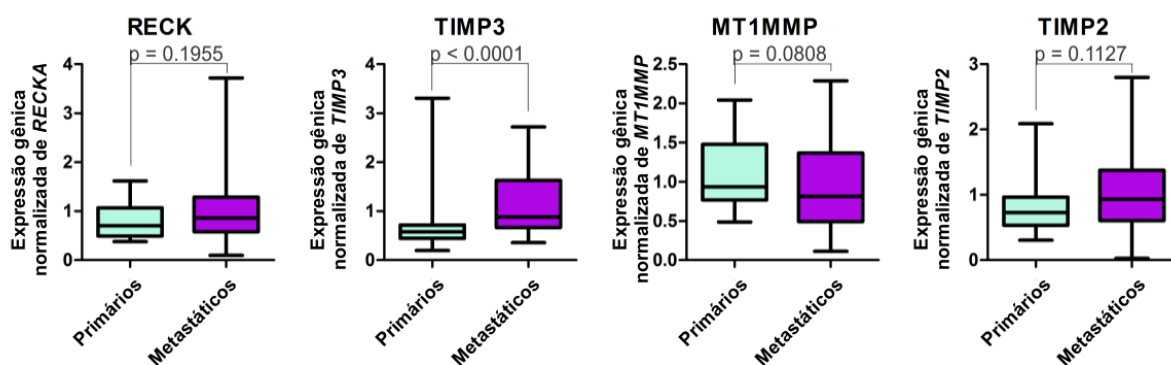


FIGURA 17 – MODULAÇÃO DOS NÍVEIS DE *RECKA*, *TIMP3*, *MT1MMP* E *TIMP2* NA PROGRESSÃO DO MELANOMA PRIMÁRIO PARA A METÁSTASE

FONTE: Jacomasso *et al.*, 2014

NOTA: Os gráficos representam as distribuições dos valores de expressão normalizados para cada grupo de amostras (azul claro para melanomas primários e vermelho para melanoma metastático). As caixas indicam o intervalo entre o segundo e o terceiro quartis (25º e 75º percentis), e as barras indicam os valores máximos e mínimos de cada grupo. As linhas dentro das caixas representam os valores medianos de expressão. As medianas foram comparadas e os valores de p calculados utilizando o teste t não paramétrico de Mann Whitney. São consideradas significativas as diferenças com valores de  $p < 0,05$ .

### 6.1.3 Relação Entre a Expressão Residual de *RECKA* e a Expressão de Genes Envolvidos em Processos Invasivos

Os resultados das análises dos dados de microarranjos depositados por Talantov *et al.* (2005) mostram a modulação dos níveis de *RECKA* durante a formação do melanoma. Além disto, fica evidenciada a conexão entre a expressão deste gene e a expressão de outros genes descritos como tendo papel importante na agressividade dos tumores. Com base nestas informações, formulamos a hipótese de que o gene *RECKA* possa ser útil como marcador de agressividade em melanoma. Para testar esta hipótese, as amostras de cada conjunto de dados foram divididas em dois grupos: as que possuem níveis de expressão de *RECKA* acima e as que possuem abaixo da expressão média do painel de amostras correspondente. Para cada conjunto de dados, a distribuição dos valores de expressão de *TIMP3*, *MT1MMP* e *TIMP2* foram comparadas entre os dois grupos. Foi observado que os grupos com maiores níveis de *RECKA* tendem a apresentar níveis maiores de *TIMP3*. Além disto, os grupos de amostras com maior expressão de *RECKA* apresentam níveis mais baixos de expressão de *MT1MMP* e *TIMP2*. Isto foi verificado tanto nos dados reunidos por Talantov *et al.* quanto nos reunidos por Xu *et al.*, como mostrado na FIGURA 18.

Estes dados indicam que altos níveis de expressão de *RECKA* estão relacionados com um perfil de expressão gênica que pode ser associado a amostras

de menor potencial invasivo (maior expressão de *TIMP3* e menor expressão de *MT1MMP* e *TIMP2*). Esta associação pôde ser observada de forma consistente em dois conjuntos de dados independentes, e que representam estágios distintos da progressão, o que evidencia a importância do gene *RECK* no estabelecimento e na progressão do melanoma.

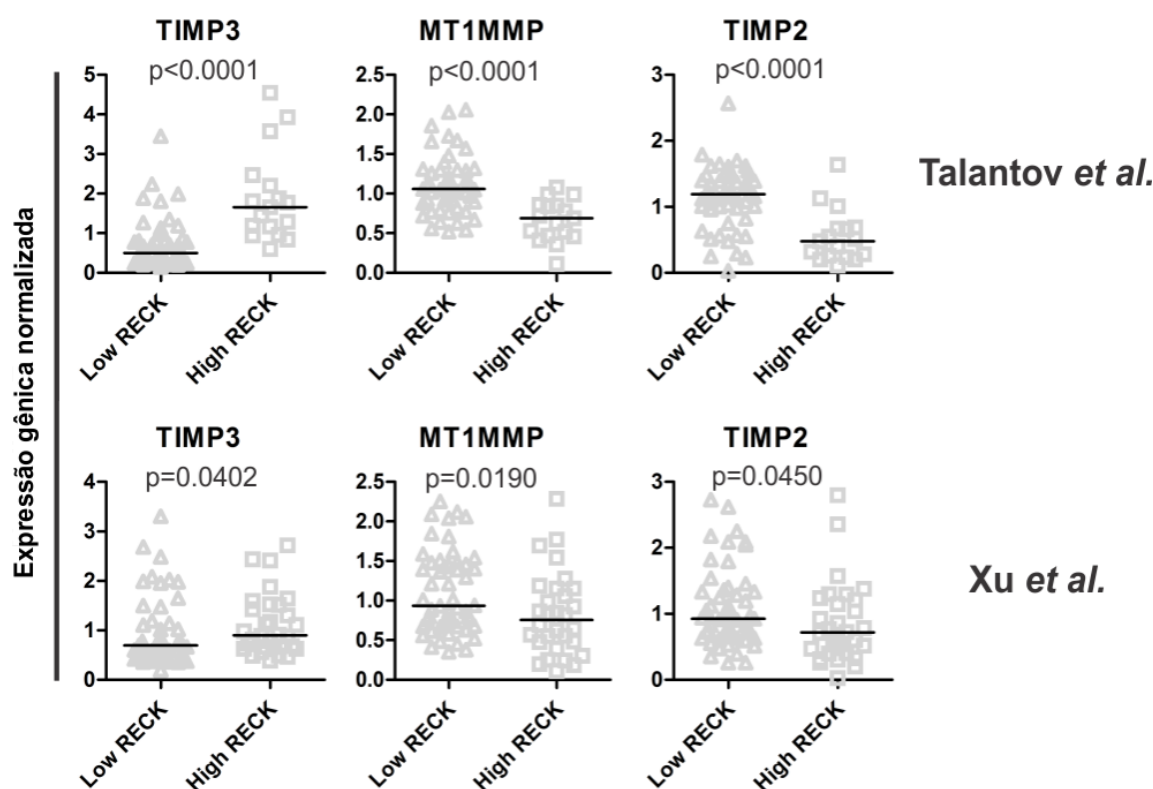


FIGURA 18 – DIFERENÇAS DOS PERFIS DE EXPRESSÃO DE *TIMP3*, *MT1MMP* E *TIMP2* ENTRE AMOSTRAS DE BAIXA E DE ALTA EXPRESSÃO RESIDUAL DE *RECKA*

FONTE: Jacomasso *et al.*, 2014

NOTA: As amostras de cada conjunto de dados (Talantov *et al.* Acima, Xu *et al.* Abaixo) foram divididas em dois grupos de acordo com a expressão residual de *RECKA* (*Low RECK*, expressão abaixo da média; *High RECK*, expressão acima da média). As barras horizontais representam a mediana dos valores de expressão de cada grupo. As distribuições dos valores de expressão de *TIMP3*, *MT1MMP* e *TIMP2* foram comparadas entre os grupos utilizando o teste t não paramétrico de Mann Whitney, e os valores de p são mostrados acima de cada gráfico. São consideradas significativas as diferenças com valores de p < 0,05.

## 6.2 PAPEL DO TRANSCRITO ALTERNATIVO *RECKB* EM MELANOMA

A análise da sequência de aminoácidos da proteína predita a partir de *RECKB* sugeriu a presença de características estruturais semelhantes às de *RECKA*, como o ancoramento GPI e um domínio relacionado à polimerização de proteínas, além de

outros domínios listados na TABELA 5. Este dado, em conjunto com dados que mostram a regulação inversa de ambos os transcritos (JACOMASSO, 2010) nos levou a formular a hipótese de que ela possa exercer funções relacionadas às da proteína canônica. Com o objetivo de realizar estudos funcionais, foram geradas linhagens de melanoma humano nas quais *RECKB* ou *RECKA* foram silenciados ou *RECKB* foi superexpresso para se verificar o fenótipo induzido por estes transcritos.

TABELA 5 – DOMÍNIOS PROTEICOS PREDITOS PARA A REGIÃO COMUM A *RECKA* E *RECKB*

Domínio	Resíduos	Probabilidade em sequências aleatórias
Sítio de N-glicosilação	39 à 42 NHSK	$5,138 \times 10^{-3}$
	86 à 89 NSSL	
	200 à 203 NYTQ	
Sítio de fosforilação por tirosina quinases	208 à 215 RNPTDSLY	min = $4,074 \times 10^{-4}$ máx. = $4,083 \times 10^{-4}$
Assinatura de domínio ZP ( <i>zona pelúcida</i> )	65 à 105	min = $2,457 \times 10^{-10}$ máx. = $2,464 \times 10^{-10}$
	hLLQRAPDyCPEtMVEIWNCM	
	NSSLPGVFKKSDGWVgLGCC	
Sítio de N-Miristoilação	27 à 32 GLAPGS	$1,397 \times 10^{-2}$
	31 à 36 GSAGAL	
	34 à 39 GALCCN	
	101 à 106 GLGCCE	
	148 à 153 GSVCCS	

NOTA: Domínios proteicos preditos a partir da sequência de aminoácidos deduzida dos primeiros oito éxons compartilhados entre *RECKA* e *RECKB*, como preditos pela ferramenta ProSite. Os aminoácidos que compõem cada domínio são representados em letras maiúsculas quando são homólogos aos aminoácidos dos domínios e em letra minúscula quando não correspondem à assinatura. Foram considerados apenas os domínios com homologia igual ou superior a 80%.

#### 6.2.1 Validação do Silenciamento Específico da Expressão de *RECKA* e *RECKB*

Em um estudo anterior conduzido por nosso grupo foi verificado que a linhagem 1205Lu, derivada de melanoma metastático, possuía os maiores níveis

basais dos transcritos *RECKA* e *RECKB* (JACOMASSO, 2010). Com base nesta informação, esta linhagem foi escolhida para a transdução de shRNAs com o objetivo de silenciar estes transcritos.

Os transcritos alternativos do gene *RECK* compartilham entre si uma grande parte da sequência de nucleotídeos. Dentre as sequências de shRNAs utilizadas neste trabalho há duas que são homólogas à regiões presentes nos oito primeiros éxons do *locus* de *RECK* e, portanto, comuns a todos os transcritos. A FIGURA 19 mostra, de forma esquemática, a organização do *locus* do gene *RECK*, a posição aproximada dos shRNAs e a estratégia utilizada no desenho dos *primers* específicos para cada isoforma.

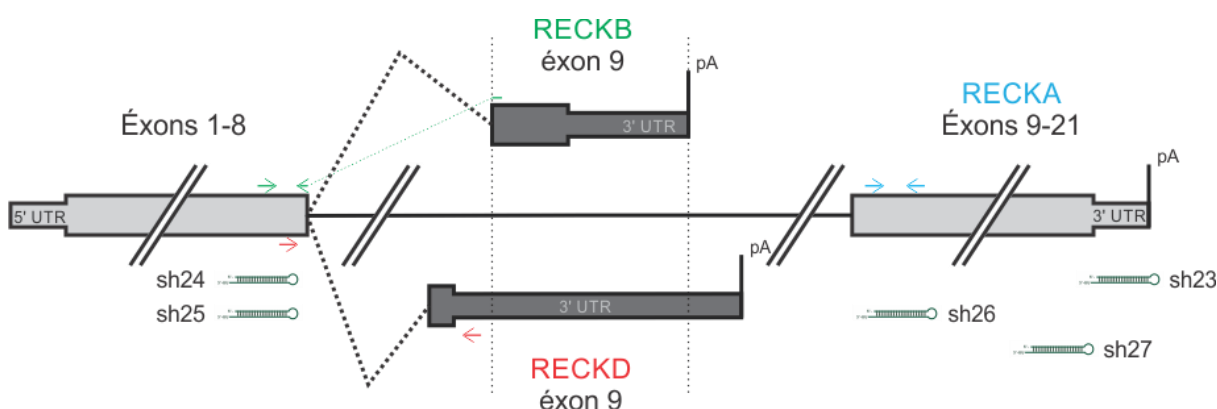


FIGURA 19 – ORGANIZAÇÃO DO *LOCUS* DE *RECK* E POSIÇÃO DO ALINHAMENTO DOS shRNAs E *PRIMERS* UTILIZADOS NESTE ESTUDO

FONTE: O Autor

NOTA: Os transcritos do *locus* do gene *RECK* são representados de forma esquemática e fora de escala. As barras representam os éxons, e as porções mais espessas representam as porções codificantes (ORFs). As setas representam os pares de *primers* utilizados para quantificar o transcrito de cor correspondente (azul para *RECKA*, verde para *RECKB* e vermelho para *RECKD*). Como o éxon exclusivo de *RECKB* encontra-se inteiramente contido no éxon 9 de *RECKD*, o primer foi desenhado para se sobrepor à junção dos éxons 8 e 9 (representado pelo intervalo pontilhado no *primer* de *RECKB*). Também são indicadas as posições aproximadas das sequências de RNAi testadas. sh24 e sh25 apresentam homologia com o éxon 8, comum a todas as isoformas. sh23, sh 26 e sh 27 apresentam homologia somente com *RECKA*. pA, poliadenilação; UTR, região não traduzida.

Sabendo disto, foi realizada a validação dos shRNAs com o objetivo de confirmar se as sequências utilizadas eram capazes de silenciar os transcritos de forma específica. Para isto, os níveis de *RECKA*, *RECKB* e de *RECKD* foram quantificados nas células da linhagem 1205Lu transduzidas com as diferentes sequências de shRNA (listadas na TABELA 1), utilizando a técnica da PCR



quantitativa em tempo real, com *primers* específicos (FIGURA 19 e TABELA 3). Os resultados são apresentados na FIGURA 20.

A quantificação revelou que sh26 foi o mais eficiente no silenciamento de *RECKA*. Os níveis de outros transcritos não foram alterados por sh26 em relação ao shScramble, utilizado como controle. Isto era esperado, uma vez que sh26 tem como alvo uma região presente apenas no transcrito canônico. Além disto, ambos os shRNA cuja sequência-alvo é comum a todos os transcritos (sh24 e sh25) foram capazes de promover uma redução estatisticamente significativa dos níveis do transcrito *RECKB*. Porém, sh24 possui um efeito mais pronunciado (porém não estatisticamente significativo) sobre o transcrito *RECKA* do que o sh25, que foi capaz de reduzir a expressão de *RECKB* de forma específica. Por fim, nenhum shRNA testado foi capaz de alterar significativamente os níveis de *RECKD* em relação à condição controle.

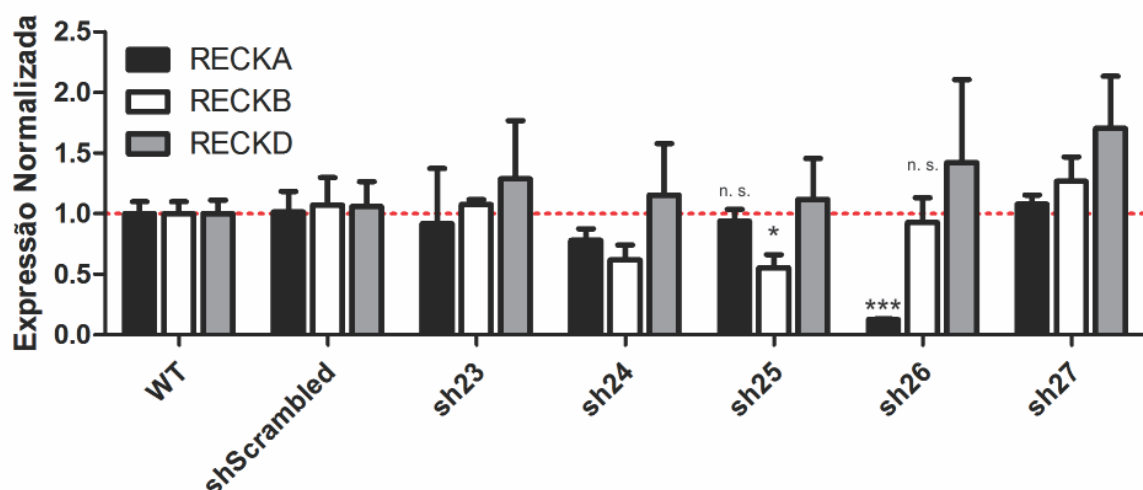


FIGURA 20 – QUANTIFICAÇÃO DA EXPRESSÃO DOS TRANSCRITOS DO GENE *RECK* EM CÉLULAS DA LINHAGEM 1205Lu TRANSDUZIDAS COM DIFERENTES shRNAs

FONTE: O Autor

NOTA: As barras indicam a média e o desvio padrão (n=3 *RECKA* e *RECKB*, n=2 para *RECKD*). A linha vermelha representa a projeção do valor de expressão basal na linhagem parental (WT), para facilitar a comparação. Para cada gene, os valores de expressão em cada linhagem gerada foram comparados utilizando ANOVA unidirecional com pós-teste de Tukey. n. s., diferença não significativa; \*, p<0,05; \*\*\*, p<0,001.

Sendo assim, concluiu-se que os melhores candidatos para o silenciamento de *RECKA* e de *RECKB* são, respectivamente sh26 e sh25. Com base nisto, nos resultados apresentados daqui por diante, sh26 e sh25 serão chamados de shRECKA e shRECKB, respectivamente. A expressão da proteína canônica, *RECKA*, também foi avaliada por *western blotting* nas linhagens transduzidas com shRECKA e



shRECKB, utilizando um anticorpo comercial cujo epítipo encontra-se na região dos motivos Kazal, que não estão presentes na proteína RECKB predita. O resultado é mostrado na FIGURA 21.

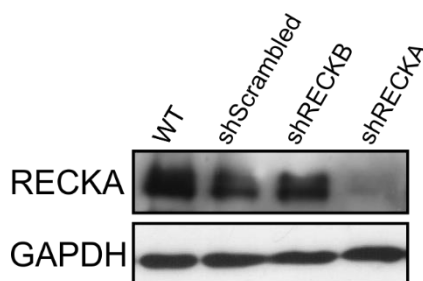


FIGURA 21 – *WESTERN BLOTTING* PARA DETECÇÃO DE RECKA NA LINHAGEM 1205Lu TRANSDUZIDA COM shRECKB OU shRECKA

FONTE: O Autor

NOTA: O *blot* foi revelado utilizando anticorpo específico para a isoforma RECKA, que revelou uma banda em aproximadamente 120 kDa. Como referência, a membrana também foi revelada com anticorpo contra GAPDH (banda de aproximadamente 35 kDa).

#### 6.2.2 Validação das Linhagens com Superexpressão de RECKB

Para determinar a função de RECKB foram geradas linhagens derivadas de 1205Lu e de WM35 que superexpressam a porção codificante deste transcrito. Esta superexpressão foi obtida pela clonagem desta ORF em um plasmídeo que possui um cassete de expressão da proteína EGFP, que permite a seleção das células pela emissão de fluorescência, utilizando um citômetro de fluxo com função *sorting*. Como controle, foi gerada uma célula transduzida com o plasmídeo contendo o cassete de expressão de EGFP, mas sem inserção da ORF de *RECKB*.

Após a seleção por citometria, as culturas foram expandidas e inspecionadas por microscopia ótica de fluorescência para assegurar que tanto a linhagem pLV-RECKB quanto a pLV-EGFP possuíam proporções semelhantes de células EGFP<sup>+</sup> ao longo das passagens. As imagens representativas destas checagens nas culturas derivadas da linhagem 1205Lu e WM35 são apresentadas nos painéis da FIGURA 22, nos quais pode-se observar que o número de células EGFP<sup>+</sup> é semelhante nos controles e nas linhagens derivadas que superexpressam RECKB. Os experimentos com estas linhagens só foram realizados se esta condição fosse satisfeita.

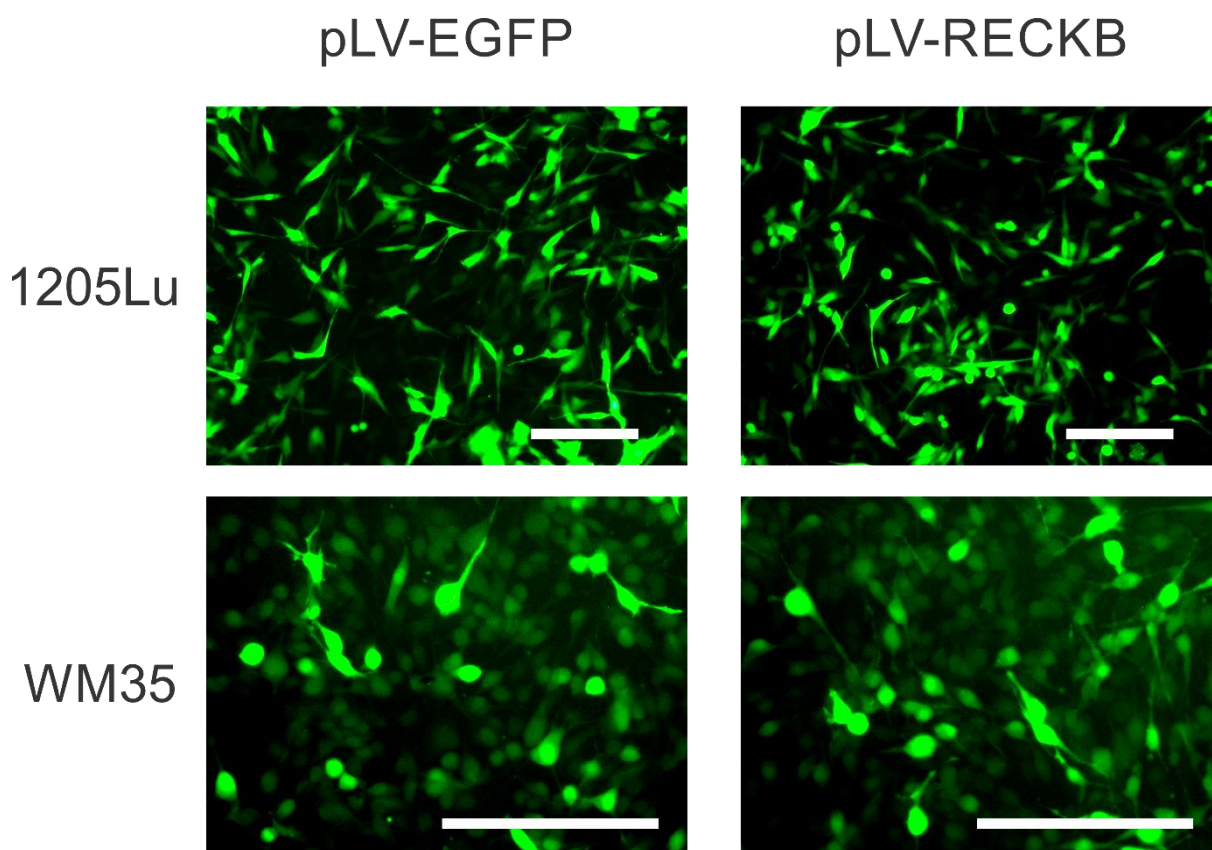


FIGURA 22 – FLUORESCÊNCIA DAS LINHAGENS DE MELANOMA TRANSDUZIDAS COM pLV-EGFP OU pLV-RECKB

FONTE: O Autor

NOTA: As imagens das linhagens 1205Lu (painéis superiores) e WM35 (painéis inferiores) transduzidas com o plasmídeo controle pLV-EGFP (painéis à esquerda) ou com pLV-RECKB (painéis à direita) foram obtidas em microscópio de fluorescência (Zeiss Axiovert), utilizando o filtro verde. Todas as linhagens estavam na mesma confluência e distribuídas de forma homogênea nas placas. Barras = 100  $\mu$ m.

Sabendo que as culturas estão satisfatoriamente enriquecidas para células EGFP<sup>+</sup>, o transcrito *RECKB* foi quantificado nas linhagens pLV-EGFP e pLV-RECKB obtidas a partir das linhagens parentais 1205Lu e WM35. O que se pode observar é que a superexpressão foi bem sucedida, produzindo uma quantidade de mRNA entre duas e três ordens de grandeza maior que nas linhagens controle, como mostra o gráfico da FIGURA 23.

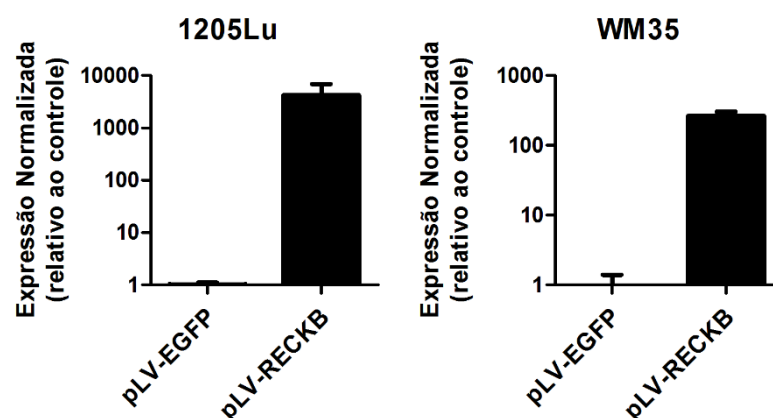


FIGURA 23 – NÍVEIS DO mRNA *RECKB* NAS LINHAGENS CONTROLE OU COM SUPEREXPRESSÃO DE *RECKB<sup>orf</sup>*

Fonte: O Autor

NOTA: O gráfico mostra os resultados da quantificação de mRNA por RT-qPCR após a superexpressão de *RECKB<sup>orf</sup>* nas linhagens 1205Lu e WM35, utilizando primers específicos para *RECKB*. As barras indicam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes. Os dados são expressos em relação à expressão do controle.

Uma vez que não estão disponíveis anticorpos comerciais que permitam a detecção e a quantificação da proteína RECKB, não foi possível confirmar se este aumento do nível do transcrito se reflete diretamente no aumento nos níveis da proteína traduzida.

### 6.2.3 Efeito da Modulação dos Níveis de *RECKA* e *RECKB* na Proliferação Celular

Como as linhagens nas quais os transcritos do gene *RECK* estão modulados são estáveis, foi possível avaliar os efeitos destas modificações na proliferação celular. Para isto foram construídas curvas de crescimento das células das linhagens 1205Lu transduzidas com shRECKA ou shRECKB. Os resultados são apresentados na FIGURA 24.

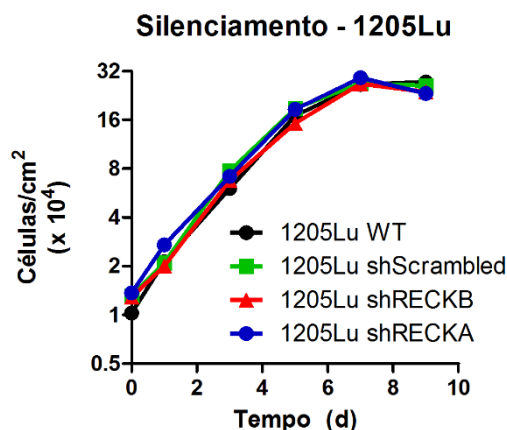


FIGURA 24 – CURVA DE PROLIFERAÇÃO DE LINHAGENS TRANSDUZIDAS COM shRECKA OU shRECKB

FONTE: O Autor

NOTA: São apresentadas as curvas referentes à proliferação das linhagens derivadas de 1205Lu transduzidas com os shRNAs indicados e selecionadas com o antibiótico puromicina. Foram contadas apenas as células aderidas não coradas por Azul de Trypan, nos tempos de 0, 1, 3, 5, 7 e 9 dias. Cada ponto representa a média e desvio-padrão de dois experimentos independentes, realizados em duplicata.

Também foi verificado o perfil de proliferação das linhagens derivadas de 1205Lu ou de WM35, transduzidas com pLV-RECKB e com pLV-EGFP, como apresentado na FIGURA 25.

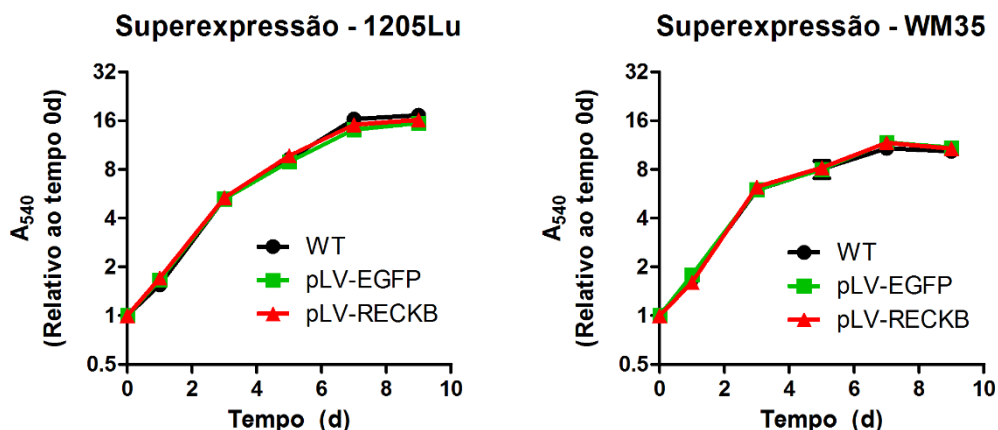


FIGURA 25 – CURVA DE PROLIFERAÇÃO DAS LINHAGENS TRANSDUZIDAS COM pLV-RECKB

FONTE: O Autor

NOTA: São apresentadas as curvas referentes à proliferação das linhagens derivadas de 1205Lu e de WM35, transduzidas com pLV-RECKB ou o plasmídeo controle, pLV-EGFP e selecionadas por FACS. Em cada tempo (0, 1, 3, 5, 7 e 9 dias), as células foram fixadas e coradas com cristal violeta. Após lavagem do corante excessivo, o cristal violeta internalizado pelas células foi solubilizado em metanol e a absorbância em 540 nm ( $A_{540}$ ) medida. Os gráficos mostram os resultados de um experimento, realizado em triplicata.

Fica claro que nenhuma modificação promoveu alterações significativas nos perfis de crescimento correspondentes às linhagens parentais. Todas as culturas

possuem o mesmo tempo de dobramento e a mesma densidade de saturação que a linhagem parental correspondente. Portanto, as diferenças entre as linhagens observadas nos experimentos seguintes não podem ser creditadas à diferenças na velocidade da proliferação.

#### 6.2.4 Expressão de MMPs e seus Inibidores Frente à Superexpressão ou ao Silenciamento dos Transcritos de *RECK*

O papel das metaloproteases de matriz extracelular e de seus inibidores na progressão e metástase de várias neoplasias, incluindo o melanoma, já é bastante descrito. Com base nos dados das análises de microarranjo mostradas na seção 6.1, podemos afirmar que a expressão de certas MMPs, TIMPs e de *RECKA* estão relacionadas entre si. Sabendo disto, foram quantificados os níveis de expressão de *MMP2*, *MMP9*, *MT1MMP*, e *TIMPs 1-3* nas linhagens derivadas da 1205Lu nas quais *RECKA* ou *RECKB* estão silenciadas, a fim de avaliar o efeito destes transcritos no perfil de expressão destes genes. Os resultados são apresentados no painel da FIGURA 26

Não foram detectadas alterações significativas entre os níveis de expressão de *MMP2*, *MMP9*, *MT1MMP*, *TIMP1*, *TIMP2* ou *TIMP3* quantificados nas linhagens derivadas da 1205Lu transduzidas com sh*RECKA* ou sh*RECKB* em relação ao controle (shScramble). A superexpressão de *RECKB*, por outro lado, promoveu aumentos estatisticamente significativos nos níveis do mRNA de *MMP9*, *MT1MMP*, *TIMP1* e *TIMP2*, além de uma redução pequena, mas estatisticamente significativa, na expressão de *TIMP3* em relação ao controle, como pode ser observado na FIGURA 27. Observa-se também que a superexpressão de *RECKB* não induz alterações nos níveis do mRNA *RECKA* ou *MMP2*.

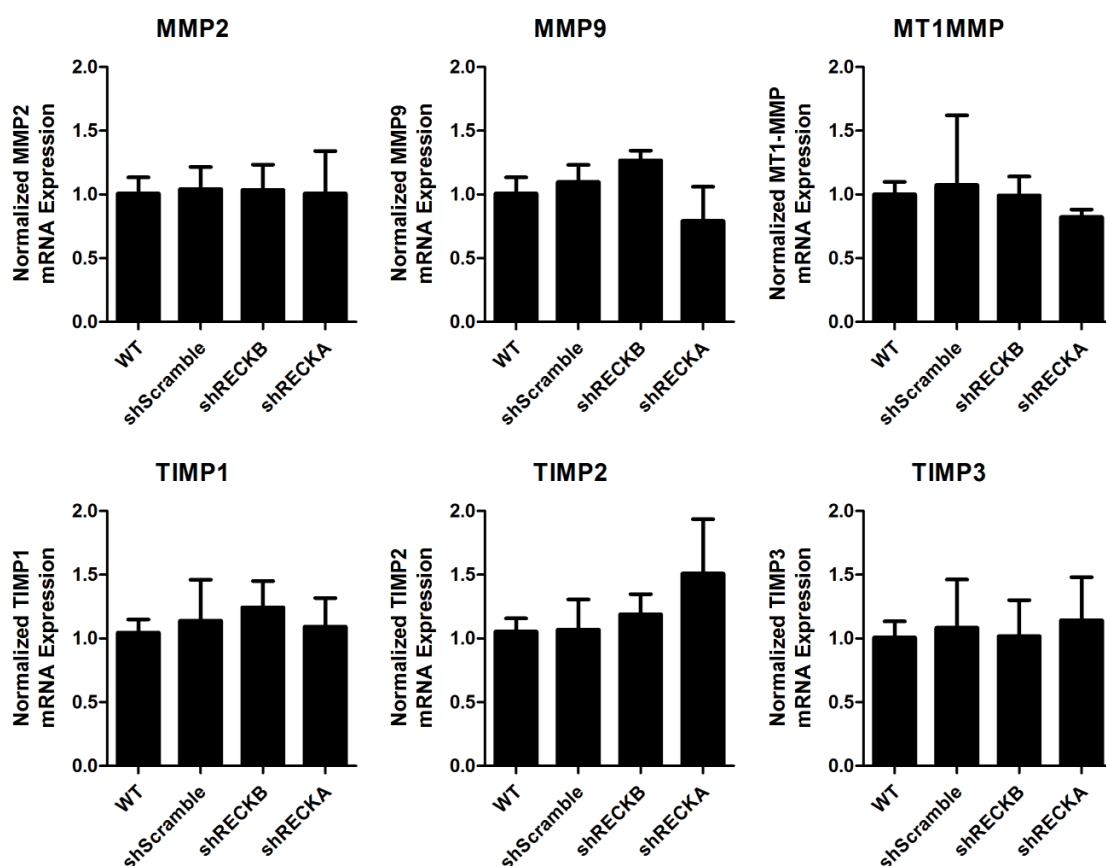


FIGURA 26 – EXPRESSÃO DE *MMPs* E *TIMPs* EM CÉLULAS DA LINHAGEM 1205Lu TRANSDUZIDAS COM shRECKA OU shRECKB

FONTE: O Autor

NOTA: Em cada gráfico as barras representam as médias e os desvios-padrão (n=3). Os valores são expressos em relação à expressão na linhagem parental (WT). Para cada gene, as diferenças entre as linhagens foram testadas para significância estatística utilizando ANOVA, seguido pelo teste de Tukey. Nenhuma diferença foi significativa.

É interessante mencionar que o aumento na expressão dos transcritos *TIMP2* e *MT1MMP* também foi observado nas análises dos dados de microarranjos descritas no item 6.1.1, assim como o aumento da expressão de *TIMP1* (ver Apêndice), e pode ser associado com fenótipos tumorais mais agressivos.

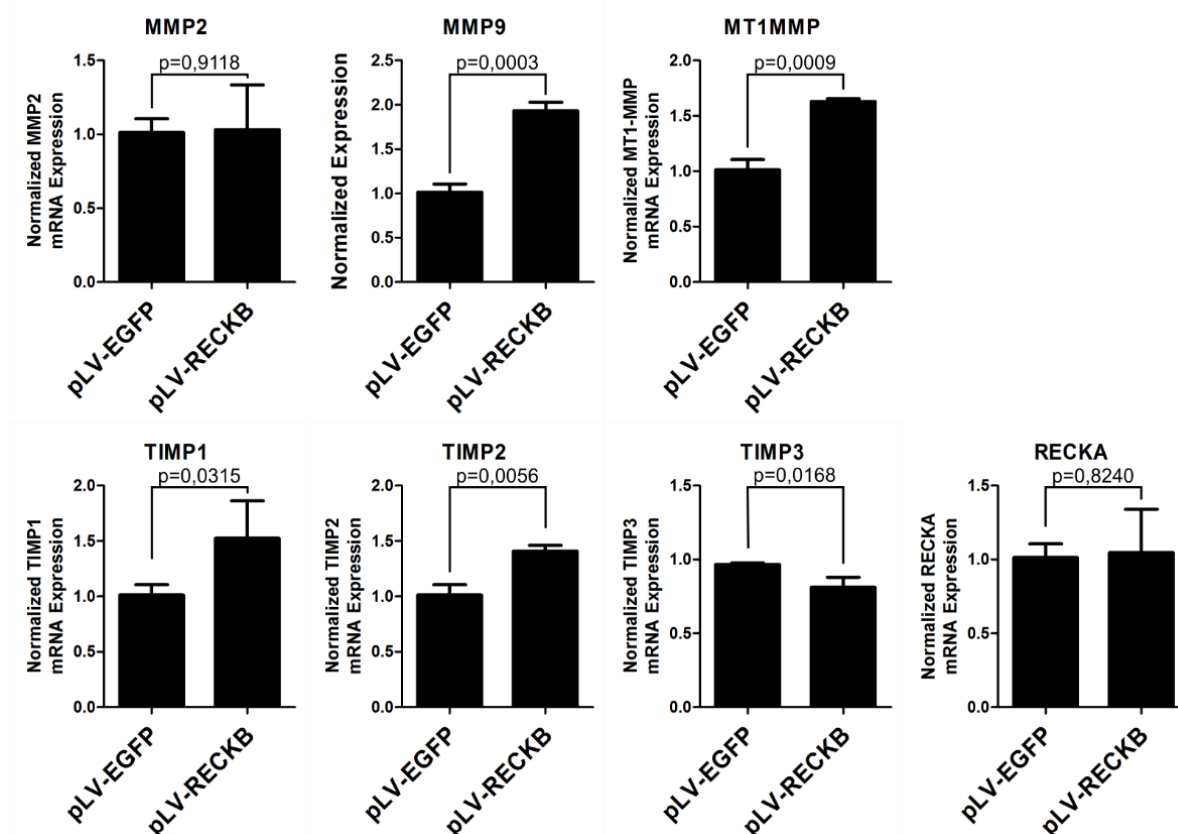


FIGURA 27 – EXPRESSÃO DE *MMPs* E *TIMPs* E *RECKA* EM CÉLULAS DA LINHAGEM 1205Lu TRANSDUZIDAS COM *RECKB<sup>orf</sup>*.

FONTE: O Autor

NOTA: Em cada gráfico as barras representam as médias e os desvios-padrão (n=3). Os valores são expressos em relação à expressão na linhagem parental (WT). Para cada gene, as diferenças entre as linhagens foram testadas para significância estatística utilizando o teste t de Student. As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0,05$ .

Com base nestes dados, concluímos que a superexpressão de *RECKB<sup>orf</sup>* gera um perfil de expressão gênica que pode ser associado ao de amostras clínicas com maior agressividade.

#### 6.2.5 Atividade Gelatinolítica em Células de Melanoma com Níveis Modulados de *RECKA* ou *RECKB*

*RECKA* é classicamente descrito como regulador negativo de *MMP-2*, *MMP-9* e *MT1-MMP* (TAKAHASHI *et al.*, 1998; OH *et al.*, 2001). Os dados apresentados na seção anterior indicam que *RECKB* é capaz de aumentar os níveis dos transcritos que codificam *MMP-9*. Além disto, ainda que a transcrição de *MMP2* não tenha sido modulada pela superexpressão de *RECKB*, *MT1MMP* e *TIMP2*, envolvidas na ativação da pró-*MMP-2*, também foram reguladas positivamente. Com base nisto, as

atividades de MMP-2 e MMP-9 foram examinadas por zimografia em gelatina. Para isto, foram utilizados meios condicionados na presença ou na ausência de matrigel pelas células derivadas de WM35 ou 1205Lu que superexpressam *RECKB<sup>orf</sup>* ou nas derivadas de 1205Lu nas quais a expressão de *RECKA* ou *RECKB* estão silenciadas. Os resultados são apresentados na FIGURA 28.

Pode-se observar que as células plaqueadas sobre o matrigel® possuem atividade de MMP-2 e MMP-9 mais intensas, com maior conversão de pró-MMP-2 e de pró-MMP-9 nas respectivas formas ativas do que as plaqueadas em substrato plástico. Porém, observa-se que não há diferenças de intensidades notáveis nas bandas correspondentes a pró-MMP-2 ou MMP-2 madura entre as linhagens com silenciamento de *RECKA* ou *RECKB* (FIGURA 28A), ou entre linhagens que superexpressam *RECKB<sup>orf</sup>*, derivadas de 1205Lu (FIGURA 28A) ou de WM35 (FIGURA 28B), em relação aos respectivos controles.



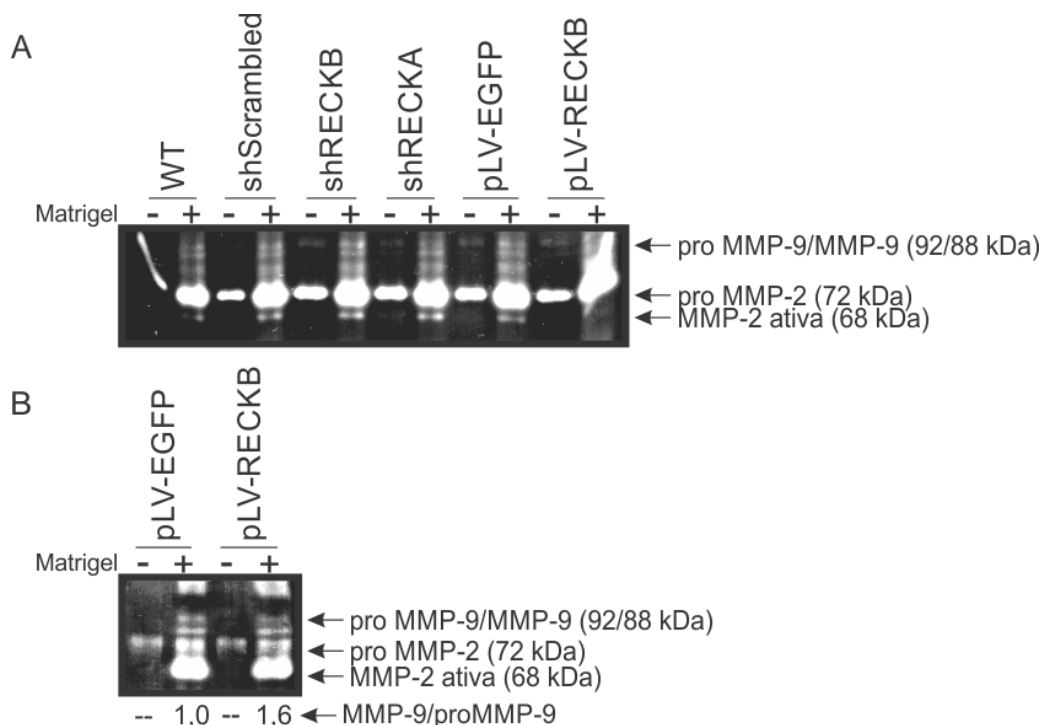


FIGURA 28 – ZIMOGRAMAS DOS MEIOS CONDICIONADOS PELAS CÉLULAS COM EXPRESSÃO MODULADA DE *RECKA* OU *RECKB* NA PRESENÇA OU NA AUSÊNCIA DE MATRIGEL

FONTES: O Autor

NOTA: Os meios condicionados pelas linhagens derivadas de 1205Lu (A) ou WM35 (B) cultivadas na presença ou na ausência de matrigel® foram submetidas à SDS-PAGE em gel co-polimerizado com gelatina. As bandas brancas representam as regiões para onde migraram as MMPs com atividade de gelatinase. Em A e em B as setas indicam as distâncias de migração relativas às gelatinases MMP-9, pró-MMP-2 e MMP-2 madura (*active* MMP-2), com os respectivos pesos moleculares. A intensidade das bandas correspondentes à pró-MMP-9 e MMP-9 ativada foram quantificadas no software ImageJ. Os valores da razão MMP-9/pró-MMP-9 são mostrados abaixo das bandas correspondentes às linhagens derivadas de WM35.

É possível perceber, entretanto, que a relação entre as intensidades das bandas correspondentes à pró-MMP-9 e à MMP-9 madura é alterada pelo silenciamento de *RECKA* na linhagem 1205Lu e pela superexpressão de *RECKB<sup>orf</sup>* na linhagem WM35 (FIGURA 28B), em relação aos respectivos controles, sugerindo a alteração na capacidade das células de ativar pró-MMP-9. Para melhor avaliar este efeito nas linhagens derivadas da 1205Lu, um novo zimograma foi gerado utilizando apenas os meios condicionados por células plaqueadas em matrigel®. O resultado é apresentado na FIGURA 29. Pode-se observar que enquanto na linhagem parental (WT) e na linhagem controle (shScramble) as intensidades das bandas correspondentes à pró-MMP-9 e MMP-9 madura são equivalentes, nas linhagens shRECKB e shRECKA há uma alteração na intensidade de uma banda em relação à outra. O silenciamento de *RECKB* parece acarretar em um acúmulo de pró-MMP-9,

enquanto que o silenciamento de *RECKA* promove um enriquecimento relativo de MMP-9 madura. Não é possível discernir diferenças na ativação de pró-MMP-2 na linhagem derivada de 1205Lu que superexpressa *RECKB*, em relação ao respectivo controle, como observado para a derivada da linhagem WM35.

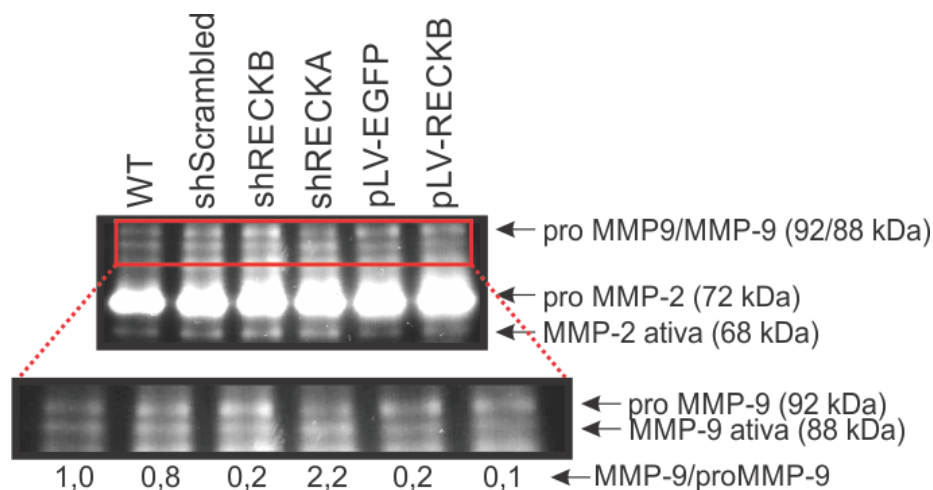


FIGURA 29 – ZIMOGRAMAS DOS MEIOS CONDICIONADOS PELAS CÉLULAS COM EXPRESSÃO MODULADA DE *RECKA* OU *RECKB* NA PRESENÇA DE MATRIGEL

FONTE: O Autor

NOTA: Os meios condicionados pelas linhagens derivadas de 1205Lu cultivadas na presença de matrigel® foram submetidas à SDS-PAGE em gel co-polimerizado com gelatina. As bandas brancas representam as regiões para onde migraram as MMPs com atividade de gelatinase. As setas indicam as distâncias de migração relativas às gelatinases indicadas, com os respectivos pesos moleculares. O painel inferior mostra em detalhes as bandas correspondentes à pró-MMP-9 e à MMP-9 madura, como indicadas pelas setas à direita.

Em resumo, *RECKA* e *RECKB* não apresentam efeitos detectáveis sobre a quantidade de MMP-2 e nem sobre a conversão de pró-MMP-2 na sua forma ativa nestas linhagens. Contudo, a superexpressão de *RECKB* na linhagem WM35, mas não em 1205Lu, parece promover a ativação de MMP-9, em um efeito análogo ao causado pelo silenciamento de *RECKA* na linhagem 1205Lu. Por fim, o silenciamento de *RECKB* nesta mesma linhagem aparentemente induz um acúmulo de pró-MMP-9.

#### 6.2.6 Capacidade Invasiva das Linhagens com Expressão Modulada de *RECKA* e *RECKB*

Para avaliar os efeitos de *RECKA* e de *RECKB* no processo invasivo de células de melanoma, as linhagens derivadas de 1205Lu que expressam RNAi contra

estes transcritos foram submetidas ao ensaio de invasão através de matrigel®. Os resultados são mostrados na FIGURA 30.

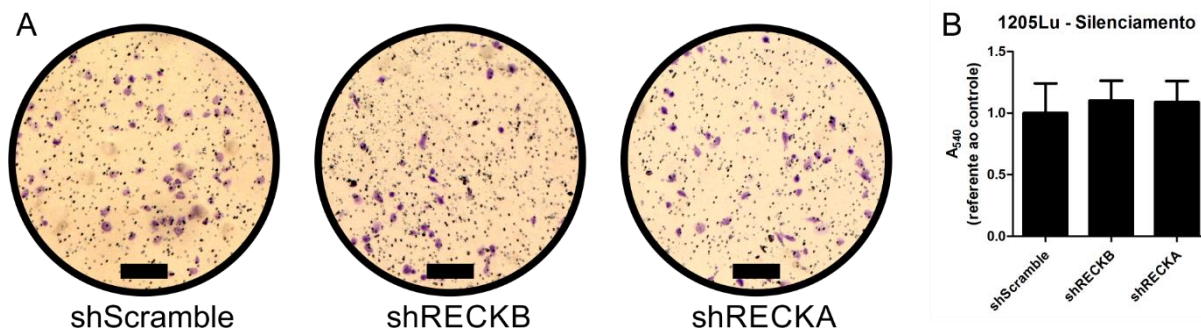


FIGURA 30 – ANÁLISE DA INVASÃO EM MATRIGEL® POR CÉLULAS COM SILENCIAMENTO DE *RECKA* OU *RECKB*

FONTE: O Autor

NOTA: Resultados do ensaio de invasão por Matrigel®. A, micrografias representativas da superfície inferior do inserto do Transwell®, após remoção das células da superfície superior e coloração com cristal violeta em três experimentos independentes realizados em duplicata. As barras de escala representam 200 µm. B, Quantificação de células invasivas, através da leitura da absorbância do cristal violeta, eluído dos insertos com metanol, em 540 nm. Os valores são representados em relação à linhagem controle (shScramble). As barras representam as médias e os desvios padrão de três experimentos independentes, feitos em duplicata. As diferenças foram testadas utilizando ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Não foram encontradas diferenças significativas entre as linhagens.

Como se pode observar, não houve diferenças significativas entre as capacidades invasivas da linhagem transduzida com o shRNA de sequência controle e as transduzidas com shRECKA ou shRECKB. Da mesma forma, não foram observadas diferenças entre a linhagem derivada de 1205Lu que superexpressa *RECKB<sup>orf</sup>* e a linhagem controle respectiva, como mostrado na FIGURA 31. Além disto, os ensaios realizados com as derivadas de WM35 que superexpressam RECKB não foram capazes de invadir o matrigel® dentro das 48h de incubação (dados não mostrados).

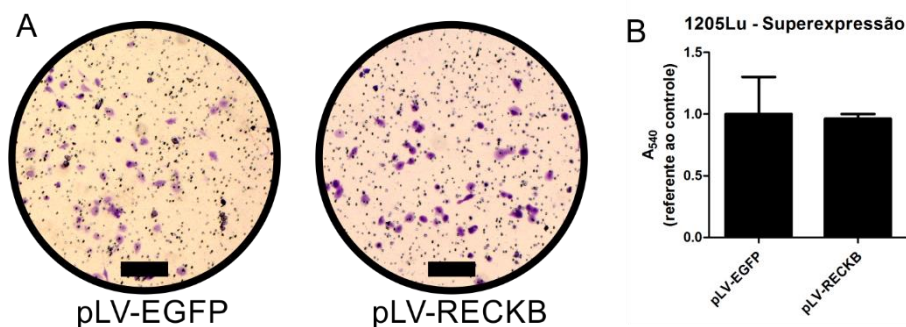


FIGURA 31 – ANÁLISE DA INVASÃO EM MATRIGEL® POR CÉLULAS QUE SUPEREXPRESSAM *RECKB<sup>orf</sup>*

FONTE: O Autor

NOTA: Resultados do ensaio de invasão por Matrigel ®. A, micrografias representativas da superfície inferior do inserto do Transwell®, após remoção das células da superfície superior e coloração com cristal violeta em três experimentos independentes realizados em duplicata. As barras de escala representam 200 µm. B, Quantificação de células invasivas, através da leitura da absorbância do cristal violeta, eluído dos insertos com metanol, em 540 nm. Os valores são representados em relação à linhagem controle (shScramble). As barras representam as médias e os desvios padrão de três experimentos independentes, feitos em duplicata. As diferenças foram testadas utilizando ANOVA seguido pelo teste de Tukey. Não foram encontradas diferenças significativas entre as linhagens.

Pode-se concluir, portanto, que a capacidade invasiva da linhagem 1205Lu não é afetada de forma detectável pela modulação dos níveis de *RECKA* ou *RECKB*. Além disto a expressão de *RECKB<sup>orf</sup>* em células da linhagem WM35 não as tornou capazes de invadir o matrigel®.

#### 6.2.7 Efeito dos Transcritos do Gene *RECK* na Capacidade de Proliferação Livre de Adesão

Células não-tumorais, em geral, necessitam aderir a um substrato para a proliferação. A ausência da ancoragem à proteínas de matriz extracelular normalmente acarreta no fenômeno conhecido por *anoikis*, ou morte celular devido à falta de adesão. Células tumorais frequentemente são resistentes ao *anoikis*, e a capacidade de proliferar em substrato semissólido é uma forma de mensurar a agressividade de um tumor (FREEDMAN e SHIN, 1974). Sendo assim, as linhagens derivadas de 1205Lu nas quais a expressão de *RECKA* ou de *RECKB* foi silenciada, ou nas quais *RECKB<sup>orf</sup>* foi superexpressa, foram plaqueadas em suspensão de agarose e o número de colônias formadas após 21 dias foi contado. Os resultados são apresentados na FIGURA 32, e mostram que as células com expressão modulada

de *RECKA* ou *RECKB* não proliferam de forma significativamente diferente das linhagens controle.

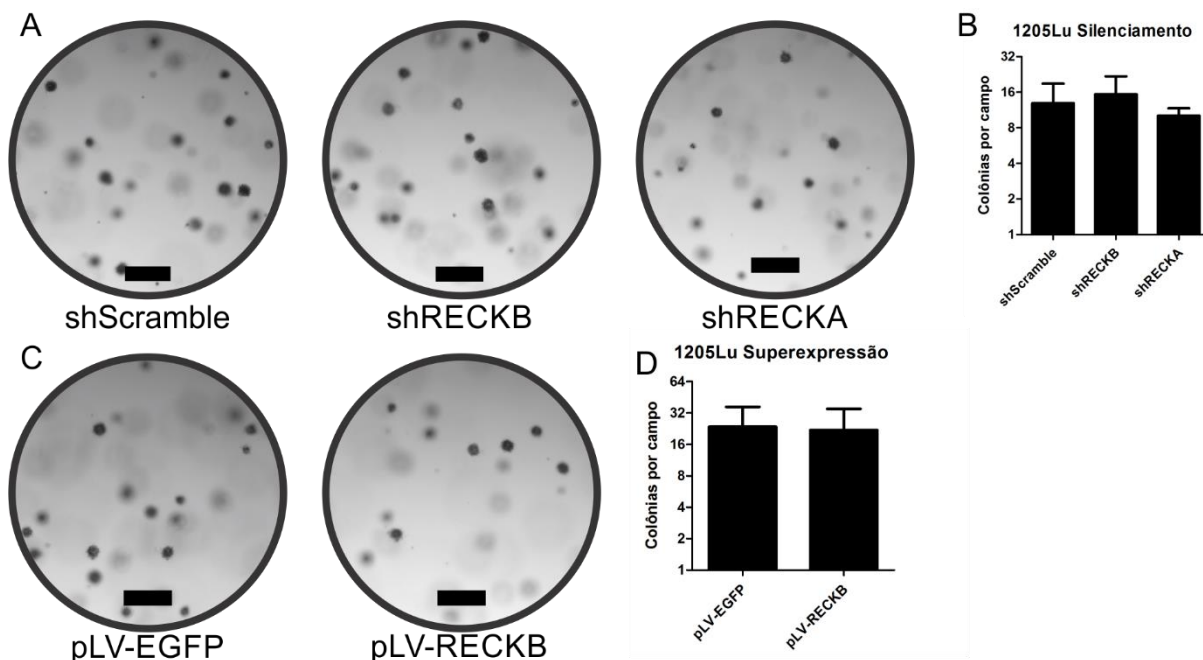


FIGURA 32 – CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS EM AGAROSE POR LINHAGENS DERIVADAS DE 1205Lu

FONTE: O Autor

NOTA: Resultados da quantificação das colônias formadas em agarose pelas linhagens com expressão modulada dos transcritos do gene *RECK*. A e C, imagens representativas da densidade de colônias nos campos fotografados correspondentes às linhagens derivadas de 1205Lu com expressão de *RECKA* ou *RECKB* silenciados (A) ou com superexpressão de *RECKB<sup>orf</sup>* (C). As barras de escala representam 100  $\mu$ m. B e D, quantificação de colônias nas linhagens com expressão de *RECKA* ou *RECKB* silenciadas (B) ou com *RECKB<sup>orf</sup>* superexpresso (D). As barras indicam a média e o desvio padrão de três experimentos independentes, feitos em duplicatas. Não foram encontradas diferenças significativas entre as médias em B ou em C, de acordo com ANOVA seguida por teste de Tukey.

Também foi testada a alteração da capacidade de formar colônias em agarose promovida pela superexpressão de *RECKB<sup>orf</sup>* na linhagem WM35, como mostra a FIGURA 33. O que se observa é que, também nesta linhagem, *RECKB<sup>orf</sup>* não altera a capacidade das células de proliferar sem adesão.

Como conclusão, a alteração da expressão de *RECKA* ou de *RECKB* não apresentam efeito sobre a capacidade das células das linhagens 1205Lu e WM35 de proliferar e formar colônias em substrato semissólido, uma vez que as suas derivadas com expressão modulada dos transcritos de *RECK* formaram tantas colônias quanto as linhagens controle.

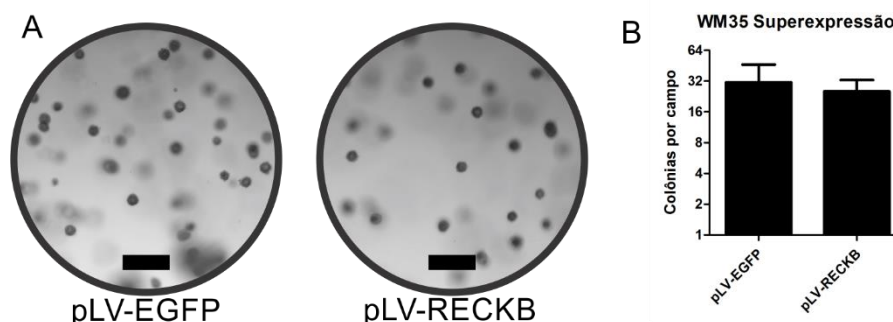


FIGURA 33 – CAPACIDADE DE FORMAÇÃO DE COLÔNIAS EM AGAROSE POR LINHAGENS DERIVADAS DE WM35

FONTE: O Autor

NOTA: Resultados da quantificação das colônias formadas em agarose pelas linhagens com superexpressão de *RECKB<sup>orf</sup>*. A, imagens representativas da densidade de colônias nos campos fotografados correspondentes à linhagem derivada de WM35 com que superexpressa *RECKB<sup>orf</sup>*. As barras de escala representam 100  $\mu$ m. B, quantificação de colônias da linhagem que superexpressa *RECKB<sup>orf</sup>*. As barras indicam a média e o desvio padrão de dois experimentos independentes, feitos em duplicatas. Não foram encontradas diferenças significativas entre as médias, de acordo com ANOVA seguido por teste de Tukey.

### 6.3 REGULAÇÃO DA RAZÃO *RECKB/RECKA*

Em estudos anteriores realizados por nosso grupo, foi demonstrado que a razão entre os níveis de expressão de *RECKB/RECKA* é maior em linhagens derivadas de melanomas metastáticos do que em linhagens derivadas de tumores primários (JACOMASSO, 2010). Porém, não se conhece as vias de transdução de sinal ou os mecanismos pelos quais os níveis de um destes transcritos são favorecidos em detrimento de outro. Portanto, a investigação de fatores envolvidos na regulação da razão *RECKB/RECKA* foi conduzida neste trabalho.

#### 6.3.1 Regulação por Vias de Sinalização Oncogênicas

Para investigar quais vias de sinalização favorecem a formação de um ou de outro transcrito, os níveis dos transcritos *RECKA* e *RECKB* foram quantificados em células da linhagem 1205Lu tratadas com inibidores farmacológicos de MEK1/2 (U0126), PI3K (LY294002), Akt (Triciribine), ROCK (Y27632) e PKC (GF109203X), que são proteína-quinases envolvidas em vias transdução de sinal importantes no estabelecimento e na progressão de diversas neoplasias, incluindo o melanoma. Após 48h de tratamento as células foram observadas ao microscópio e fotografadas para a análise das alterações morfológicas e, posteriormente, lisadas para extração do RNA total para quantificação da expressão.



Dentre os fármacos testados, apenas U0126 e LY294002 promoveram alteração na morfologia das células aderentes, como observado no painel da FIGURA 34. A inibição de MEK1/2 por U0126 promoveu um aumento no número de células desaderidas, enquanto que as aderidas apresentaram morfologia distinta do controle, com aumento no número de prolongamentos. A inibição de PI3K por LY294002 tornou as células mais isométricas e achatadas que o controle, sem aumentar apreciavelmente o número de células desaderidas. Os demais tratamentos não promoveram alterações morfológicas perceptíveis.

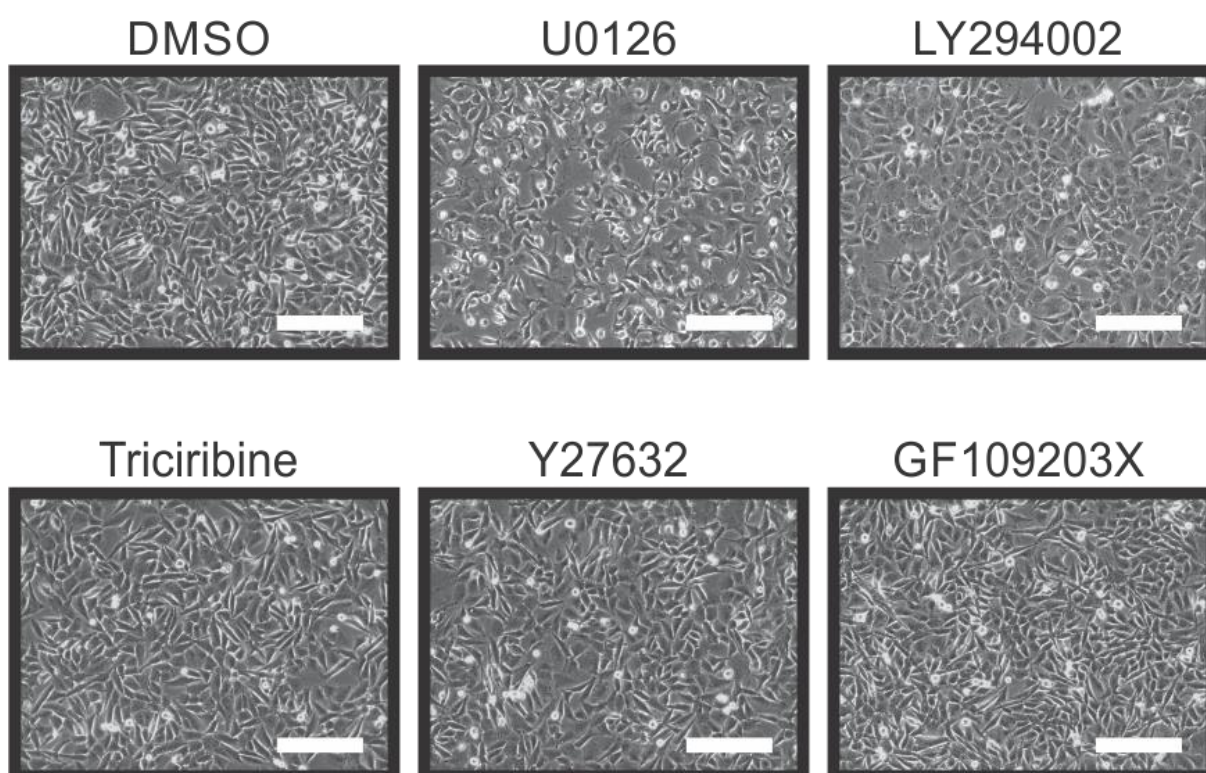


FIGURA 34 – MORFOLOGIA DAS CÉLULAS DA LINHAGEM 1205Lu APÓS INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DE VIAS DE TRANSDUÇÃO DE SINAIS ONCOGÊNICOS

FONTE: O Autor

NOTA: Os painéis mostram as micrografias das células após os tratamentos indicados. As micrografias foram feitas utilizando contraste de fase. Barras = 200  $\mu$ m.

De forma interessante, os tratamentos com U0126 e LY294002 também foram os mais eficazes na modulação dos níveis de *RECKA* e *RECKB*, como observado na FIGURA 35. A inibição de MEK1/2, e portanto da via das MAPK, promoveu um aumento de cerca de dez vezes em relação ao controle nos níveis do transcrito alternativo *RECKB*. O mesmo tratamento não promoveu alterações significativas nos níveis do transcrito canônico, *RECKA*. Por outro lado, o tratamento das células com o

fármaco LY294002, um inibidor da enzima fosfoinosítídeo-3-quinase (PI3K) que está envolvida na produção do segundo mensageiro inositol-3-fosfato, promoveu um aumento de cerca de duas vezes nos níveis de *RECKA*, sem alterar os níveis de *RECKB* em relação ao tratamento com veículo. Por sua vez, a inibição de Akt, um alvo *downstream* de PI3K, promoveu um aumento estatisticamente significativo de cerca de 1,5 vezes nos níveis do transcrito alternativo *RECKB* em relação ao tratamento com o veículo, sem promover alteração significativa dos níveis do transcrito canônico.

A razão *RECKB/RECKA* também foi modulada pela inibição da proteína quinase C (PKC). Este tratamento promoveu a redução dos níveis do transcrito *RECKB* para cerca de 50% dos níveis observados no tratamento com o veículo, sem alterar os níveis do transcrito canônico.

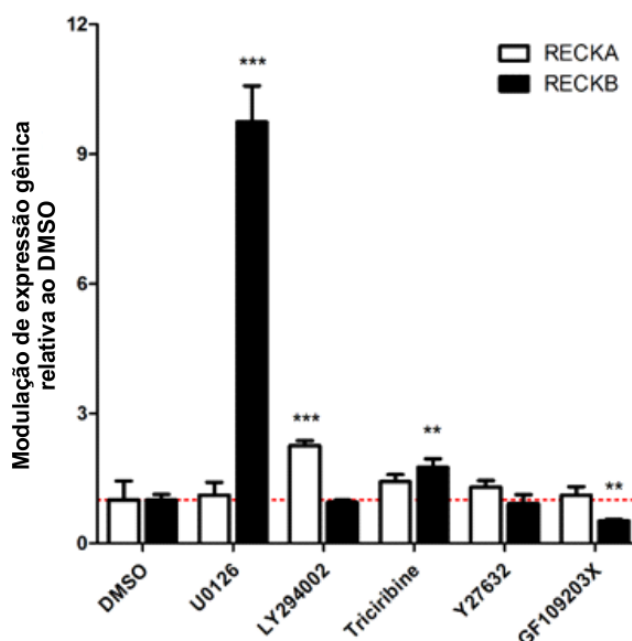


FIGURA 35 – NÍVEIS DE mRNAs DE *RECKA* E *RECKB* NA LINHAGEM 1205Lu APÓS INIBIÇÃO FARMACOLÓGICA DE VIAS DE TRANSDUÇÃO DE SINAIS ONCOGÊNICOS

FONTE: O Autor

NOTA: As barras representam as médias e os desvios-padrão (n=3) dos níveis de *RECKA* (barras brancas) e *RECKB* (barras pretas) após incubação com os fármacos U0126 (inibidor de MEK1/2), LY294002 (inibidor de PI3K), Triciribine (inibidor de Akt), Y27632 (inibidor de ROCK) e GF109203X (inibidor de PKC). Os valores são expressos em relação à expressão após o tratamento com o veículo utilizado para dissolver os fármacos (DMSO), projetada na linha pontilhada para facilitar a comparação. \*\*, p<0,01; \*\*\*, p<0,001 em relação ao tratamento com veículo, de acordo com o teste t de Student.

Também foram avaliados os efeitos dos tratamentos sobre a fosforilação de ERK1/2 e sobre os níveis da proteína canônica, *RECKA*, como mostrado na FIGURA 36. Assim como os níveis de mRNA, os níveis proteicos de *RECKA* não foram



alterados por U0126, Y27632 e GF109203X. O fármaco LY294002 promoveu, além do aumento nos níveis de mRNA de RECKA, um aumento dos níveis da proteína RECKA. Por fim, o fármaco Triciribine – inibidor específico de Akt, um alvo *downstream* de PI3K – promoveu a redução dos níveis proteicos de RECKA, ainda que não tenha alterado significativamente os níveis do mRNA mensageiro correspondente.

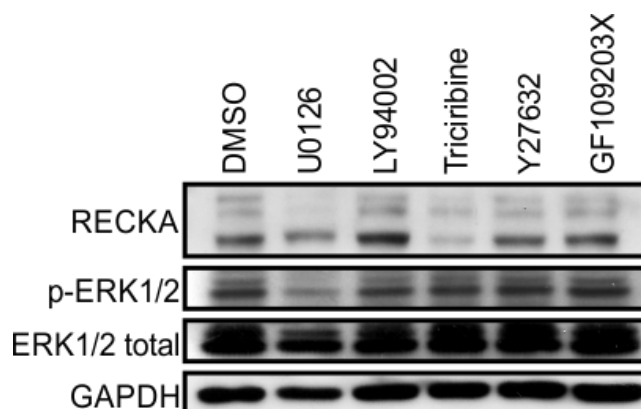


FIGURA 36 – NÍVEIS PROTEICOS DE RECKA E DA FORMA FOSFORILADA DE ERK1/2 APÓS TRATAMENTO COM INIBIDORES FARMACOLÓGICOS DE TRANSDUÇÃO DE SINAIS ONCOGÊNICOS.

FONTE: O Autor

NOTA: As proteínas foram extraídas após os tratamentos com fármacos U0126 (inibidor de MEK1/2), LY294002 (inibidor de PI3K), Triciribine (inibidor de Akt), Y27632 (inibidor de ROCK) e GF109203X (inibidor de PKC). Foram utilizados anticorpos específicos para RECKA (110kDa), ERK1/2 total e fosfo-ERK1/2 (42/44 kDa). Como referência foi utilizado anticorpo para GAPDH (35 kDa).

Os resultados apresentados na FIGURA 36 também mostram que, além de aumentar os níveis do transcrito alternativo *RECKB* (FIGURA 35), o fármaco U0126 promove a inibição da fosforilação de ERK1/2. Além disto, nenhum outro fármaco alterou a fosforilação de ERK1/2, o que indica que os efeitos observados após a incubação das células com estes outros fármacos não dependem desta via.

Em conjunto, estes dados mostram que as vias de sinalização que encontram-se frequentemente desreguladas em melanoma podem modular os níveis dos transcritos individualmente o que pode ser um indício de que elas ativam ou inativam fatores específicos para cada isoforma.

### 6.3.2 Regulação do *Splicing* Alternativo do Transcrito Primário do Gene *RECK*

Os fatores reguladores de *splicing* da família de proteínas ricas em serina (*serine-rich splicing factors*, SRSF) são possíveis candidatos a intermediários da regulação da razão *RECKB/RECKA* por estarem envolvidos na seleção de éxons que irão compor o mRNA maduro e por serem regulados por vias de transdução de sinais como as analisadas acima (BLAUSTEIN *et al.*, 2005; YEA *et al.*, 2008). Para se verificar a possível conexão entre as vias de sinalização e a regulação dos níveis de cada transcrito, as sequências dos éxons 9 de *RECKA* e de *RECKB* foram submetidas à análise utilizando a ferramenta ESE Finder 3.0 (CARTEGNI *et al.*, 2003; SMITH *et al.*, 2006), que busca regiões específicas, chamadas de regiões exônicas indutoras de *splicing* (*exonic splicing enhancer* – ESE), onde podem ligar-se fatores de *splicing* da família SRSF. As regiões de ligação de SRSF1, SRSF2, SRSF5 e SRSF6 que obtiveram maior *score* atribuído pela ferramenta são apresentadas na FIGURA 37.

Foram detectados sítios de ligação às proteínas SRSF com *score* acima do mínimo em ambos os éxons mutuamente exclusivos de *RECKB* ou *RECKA*. Podemos observar ainda que os *scores* obtidos para SRSF2, SRSF5 e SRSF6 em *RECKB* e *RECKA* são semelhantes. O *scores* obtidos para SRSF1, porém, são distintos entre éxons 9 dos dois transcritos, estando bastante acima do mínimo no sítio detectado em *RECKB* e mais baixo em *RECKA*. Isto pode indicar que o sítio de ligação em *RECKB* é mais forte, e que a razão *RECKB/RECKA* pode ser regulada diretamente por SRSF1. Se esta hipótese for verdadeira, o silenciamento de SRSF1 reduziria a razão *RECKB/RECKA*.

Para verificar se isto ocorre, buscou-se por dados de sequenciamento de transcriptoma depositados no banco de dados SRA que pudessem ser usados para testar a nossa hipótese. Foi selecionado o experimento conduzido por Saltzman *et al.* (2011) no qual foi realizado o RNA-Seq de células HeLa após o silenciamento da expressão de *SRSF1*. Através da análise bioinformática dos dados, foram calculados os valores de FPKM, que são proporcionais à expressão absoluta de cada transcrito. Os resultados obtidos são apresentados na TABELA 6.

**RECKB**

5'-Exons1to8-

GGCCTCCTGATGAAGCTGCACCTGAAATGGCTCTTCAGAGTCT  
 CCGCTTTGTACATCCTGGAATCCATTTCTTCACCTAGAGGTG  
 ACCAGATTTATAAAAACTGACTGATTGACCAAAGTACCAAAG  
 ACTGATTTATAAGATGTCAATGTTTTGATTTACACTGTGATAT  
 TGAAAGAGGCTCTGTGGCTTATGTCTGTAATCTCAGCGCTTGT  
 TGATGCTGAGGCAGGAGAATTGCTTGAGGCCAAGAGTTTGAGA  
 CCAGCCTGGGTAAACAAAGTGAACCCAGCTCTACAAAAAAT  
 AATAATAATAATTAGCTGGGTGTGGTGACACACCCAGCTCCTC  
 AGGAGGCTGATGCTGGAGGATCGCTTGAGCCCAAGAGTTCAAG  
 GTTGCAGTGAGCCATCATCACTTCACTGCACTCCAGCCAGGGC  
 AACAAAGCAAGACCCTGCCTCGGGGGGAAAAAAGATGAAA  
 AGAAAGAAAGACTTGTTTTTTGTAACCTAGTAGCAGTACTGTG  
 TGCTTTGTTTGGCCACCATCTAAATCAGAACTCTAATGGCTTT  
 TGACATCCTTTGGTGTAGCTGTGTGGTCAAAATCAGAGGATGA  
 AGCATTGCCCAATAACCTTCATTTGTTTTAAAGGCAGATCTG  
 TGCTCTCTGACATTTAGTCTATACGAGATACTGCTGGAGCTAA  
 GGAGATGGCAGCTCAATAAAAAAGCAGAAAGAGGTTTAAAGG  
 TAGAACACCGTCTCCATCTTTGCCAATACAGAGGAATCTGGA  
 AAAGAAGGCGCCAAACAGATATGCACAGATTCTTCCAAAGTC  
 AGAGAAAATACTTCAAGAAGCCCTTCTGAATTCTGTAATAT  
 GGTGAAAG-p (A) -3'

**RECKA**

5'-Exons1to8-

GTTTATATTGCTGTGACAGAGCTGAAGACCATGCTTGCCAAAA  
 TGCCTGCAAGAATACTCTGATGTCCAAAGAAACGGAAATGGAG  
 ATTGTTGATGGTCTCATCGAGGGTTGTAAGACCCAGCCCTTGC  
 CTAAGATCCTCTTTGGCAATGTTTTCTTGAAAGCTCACAATC  
 TGTTACCCCTGGAGTCACTGTACACCCTCCTCCCTCTACAGGC  
 CTCGATGGGGCTAAATTGCATTGTTGTTCTAAAGCAAACACTT  
 CAACATGTAG-Exon10to21-p (A) -3'

	RECKB	RECKA
<b>SRSF1 (threshold: 1,956) Score:</b>	<b>5,73874</b>	<b>2,94284</b>
<b>SRSF2 (threshold: 2,383) Score:</b>	<b>4,88491</b>	<b>4,84928</b>
<b>SRSF5 (threshold: 2,67) Score:</b>	<b>5,23604</b>	<b>5,65565</b>
<b>SRSF6 (threshold: 2,676) Score:</b>	<b>4,91856</b>	<b>3,83191</b>

FIGURA 37 – PREDIÇÃO DOS SÍTIOS DE LIGAÇÃO DE PROTEÍNAS SRSF NOS ÉXONS 9 DOS TRANSCRITOS *RECKA* E *RECKB* PELA FERRAMENTA ESE FINDER 3.0

FONTE: O Autor

NOTA: As sequências dos nonos éxons de *RECKB* e *RECKA* são mostradas. Em cada sequência foram marcados os possíveis sítios de ligação das quatro proteínas SRSF listadas abaixo, cada uma com sua respectiva cor. A tabela mostra os scores dos sítios preditos em cada transcrito. Além disto, mostra também o score mínimo (*threshold*) para que um candidato a sítio seja considerado como possível pelo algoritmo.

O que se observa é que o silenciamento de *SRSF1* por RNAi acarreta um aumento global na quantidade de *reads* mapeados no *locus* do gene *RECK*, indicado pelo maior valor de FPKM do gene todo. Analisando-se cada transcrito individualmente, observa-se que o valor de FPKM de *RECKA* é maior nas células tratadas com o si*SRSF1* do que nas tratadas com o siControle, enquanto que *RECKB* apresenta valores semelhantes entre as duas condições. Se levarmos em conta o aumento global da transcrição do gene (representado pelo aumento de FPKM total do *locus*), a proporção de *RECKB* encontra-se reduzida. Além disto, o transcrito *RECKD* também encontra-se menos expresso nas células tratadas com o si*SRSF1*.

TABELA 6 – EXPRESSÃO DOS TRANSCRITOS DO GENE *RECK* APÓS O SILENCIAMENTO DE *SRSF1* EM CÉLULAS HeLa

		Locus <i>RECK</i> *	<i>RECKA</i>	<i>RECKB</i>	<i>RECKD</i>
siControle	FPKM	2,62572	1,33896	0,31568	0,971978
	LC 95% inferior	2,11274	1,13138	0,039347	0,62618
	LC 95% superior	3,1387	1,54654	0,592013	1,31603
	Cobertura	-	3,63536	0,857088	2,63653
siSRSF1	FPKM	3,3244	2,22649	0,347113	0,75796
	LC 95% inferior	2,86299	2,00833	0,089852	0,489782
	LC 95% superior	3,78582	2,44466	0,604374	1,01181
	Cobertura	-	4,68316	0,730112	1,57921

NOTA: \*dados relacionados à todos os *reads* mapeados no locus *RECK*, o que corresponde à soma dos valores de FPKM de todos os transcritos do gene. Os transcritos foram identificados de acordo com os números de acesso do banco de dados Ensembl (gene *RECK*, ENSG00000122707; transcrito *RECKA*, ENST00000373966; transcrito *RECKB*, ENST00000475774 e transcrito *RECKD*, ENST00000479053). LC, limite de confiança; FPKM, fragmentos por kb mapeada.

Portanto, a razão *RECKB/RECKA* é modulada por *SRSF1*, que favorece a formação dos transcritos *RECKB* e *RECKD* em detrimento de *RECKA* em células HeLa utilizadas naquele estudo. Para verificar se *SRSF1* pode ser o responsável pelo aumento, após a metástase, da razão *RECKB/RECKA* observado por nosso grupo, a expressão deste gene foi analisada nos conjuntos de amostras de Talantov *et al.* (2005) e Xu *et al.* (2008). Os resultados são apresentados na FIGURA 38, na qual observa-se que os níveis de expressão do gene *SRSF1* são maiores em melanomas malignos do que em tecidos normais. Também fica claro que, de forma interessante, *SRSF1* é mais expresso em melanomas metastáticos do que em melanomas primários, fato este que corrobora o aumento da razão *RECKB/RECKA* observada no estudo anterior desenvolvido em nosso grupo (JACOMASSO, 2010) e está de acordo com a nossa hipótese de que *SRSF1* é um regulador direto da razão *RECKB/RECKA* em melanoma.

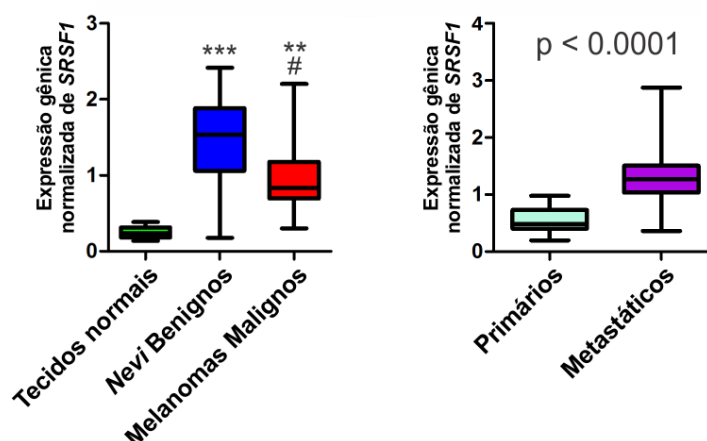


FIGURA 38 – MODULAÇÃO DOS NÍVEIS DE *SRSF1* NA TRANSFORMAÇÃO MALIGNA DO MELANÓCITO E NA PROGRESSÃO PARA A METÁSTASE

FONTE: O Autor

NOTA: Os gráficos representam as distribuições dos valores de expressão normalizados para cada grupo de amostras dos painéis publicados por Talantov *et al.* (a esquerda) e por Xu *et al.* (a direita). As caixas indicam o intervalo entre o segundo e o terceiro quartis (25º e 75º percentis), e as barras indicam os valores máximos e mínimos de cada grupo. As linhas dentro das caixas representam os valores medianos de expressão. As distribuições foram comparadas utilizando o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não-paramétrico) no gráfico da esquerda e o teste t não paramétrico de Mann Whitney no gráfico da direita. \*\*\*, p<0,0001 em relação aos tecidos normais, \*\*, p<0,01. #, p<0,05 em relação aos *nevi* benignos.

Destes dados podemos concluir, portanto, que a regulação da razão *RECKB/RECKA* é dependente de sinais transduzidas por vias sabidamente envolvidas em melanoma. Além disto, em células HeLa, *SRSF1*, que é ativado pelas vias de PI3K e das MAPK e cuja expressão encontra-se mais elevada em melanoma metastático, promove a modulação da razão *RECKB/RECKA*.

### 6.3.3 *RECKB* como Alvo de microRNAs

Outro mecanismo que pode estar envolvido na regulação da razão *RECKB/RECKA* é o silenciamento de uma ou de outra isoforma do transcrito por microRNAs (miRNA). Os miRNA atuam reduzindo a estabilidade do mRNA maduro ou impedindo sua tradução. O transcrito *RECKA* é alvo de diversos miRNAs, muitos deles frequentemente associados à tumorigênese, como o miR-21 e o miR-221. Para avaliar se o transcrito *RECKB* é alvo de miRNAs, a sequência deste mRNA foi submetida à análise pela ferramenta RegRNA 2.0 (CHANG *et al.*, 2013) que busca, além de sequências homólogas às *seeds* de miRNA conhecidos, outros motivos

presentes na sequência. A TABELA 7 mostra a lista dos miRNAs com potencial para regular *RECKB*.

TABELA 7 – SÍTIOS DE LIGAÇÃO DE MICRO RNAs PRESENTES NO mRNA *RECKB*

Micro RNA	Posição	Número de bases	Sequência
hsa-miR-23a-5p	693~716	24	CAATCTTATCCAATGAGGAACCCA
hsa-miR-1285-5p	1077~1097	21	CCTGGGTAACAAAGTGAGAAC
hsa-miR-1304-3p	1192~1213	22	AGAGTTCAAGGTTGCAGTGAGC
hsa-miR-4452	1178~1200	23	ATCGCTTGAGCCCAAGAGTTCAA
hsa-miR-3135b	1217~1239	23	CATCACTTCACTGCACTCCAGCC

NOTA: A tabela mostra uma lista dos miRNAs cuja sequência é complementar à alguma região do mRNA *RECKB*, de acordo com a busca pela ferramenta RegRNA 2.0, disponível em <http://regrna2.mbc.nctu.edu.tw/index.html>.

Dos miRNA listados, somente hsa-miR-23a-5p possui homologia também com o transcrito *RECKA*. Os sítios de ligação dos demais encontram-se na região 3'-UTR, presentes somente nos transcritos alternativos *RECKB* e *RECKD*. Apesar de, no momento, não existir validação experimental da ação destes microRNAs na regulação dos transcritos alternativos do gene *RECK*, a detecção dos sítios prováveis, presentes nas regiões 3'-UTR, fornece indícios de que a razão *RECKB/RECKA* pode ser regulada também por este mecanismo.

## 7 DISCUSSÃO

O número de casos de câncer de pele tipo melanoma, apesar de ser pequeno em relação a outras neoplasias, vem aumentando em todo o mundo (REED *et al.*, 2012). Este tipo de câncer representa um desafio terapêutico, por sua forte tendência a gerar metástases, cuja formação correlaciona com o decréscimo da taxa de sobrevida dos pacientes (CUMMINS *et al.*, 2006). Sendo assim, um diagnóstico precoce, que permita a excisão cirúrgica da lesão antes da metástase, é a melhor forma de proporcionar melhores prognósticos aos pacientes.

Os métodos para diagnóstico do melanoma estão fortemente baseados nas análises clínicas e patológicas. A análise patológica consiste na observação das características histológicas das lesões, classificando-as de acordo com a localização (classificação de Clark), profundidade (índice Breslow) (BRESLOW, 1970) e o *status* de colonização dos linfonodos vizinhos. Devido à natureza destas análises é frequente o melanoma ser detectado de forma tardia, uma vez que não há testes laboratoriais estabelecidos que possam ser utilizados em exames de rotina para o diagnóstico ou para se estimar o prognóstico de pacientes com melanoma. Por este motivo, a busca de marcadores para melanoma tem sido objeto de diversos estudos (FERNANDEZ-FLORES, 2012).

Esta busca por marcadores, porém, tem sido frustrante, uma vez que ainda não foi possível encontrar marcadores robustos o suficiente e tão confiáveis quanto a análise histológica (SCHRAMM *et al.*, 2012; FRANCISCO *et al.*, 2013). Esta dificuldade pode ser atribuída ao fato de o melanoma ser um tipo de tumor muito heterogêneo, carregando mais mutações por célula do que qualquer outro tipo de tumor (BERGER, M. F. *et al.*, 2012). Isto implica em dizer que o termo “melanoma” engloba um conjunto de condições que podem apresentar perfis moleculares e genéticos bastante distintos (VIDWANS *et al.*, 2011).

A identificação de novos marcadores pode ser feita através da análise em larga escala da expressão gênica em painéis de amostras representativas de uma determinada população em conjunto com os dados clínicos dos pacientes. Das técnicas que permitem a análise em larga escala da expressão gênica, a mais utilizada é a de hibridização dos mRNA extraídos de amostras de tumores em lâminas de microarranjos. Os dados referentes à expressão dos transcritos representados nesta lâmina, em associação com os dados clínicos das amostras, são utilizados para a

seleção de candidatos à marcadores. Estas análises em larga escala, porém, podem fazer com que muitos dados relevantes sobre a expressão de subconjuntos específicos de genes passem despercebidos. Por isto, dados de expressão obtidos de grandes painéis de amostras podem representar uma grande fonte de informações inexploradas (PLOCIK e GRAVELEY, 2013).

No presente trabalho, foram utilizados dois conjuntos de dados de microarranjos, reunidos de forma independente, que representam as etapas da formação e da progressão do melanoma desde tecidos normais e lesões benignas (TALANTOV *et al.*, 2005) até melanomas metastáticos (XU *et al.*, 2008), para verificar o perfil de expressão de um subconjunto de genes composto por *MMP2*, *MMP9* e *MMP14* (*MT1MMP*) e seus inibidores, *TIMP1*, *TIMP2*, *TIMP3* e *RECKA* (seção 6.1).

Inicialmente, observamos que os perfis de expressão deste subconjunto de genes fornecem informações suficientes para que a análise de *clustering* hierárquico agrupe as amostras de acordo com o tipo da lesão de origem (tecidos normais, *nevi* benignos ou melanoma malignos) (FIGURA 12). Este agrupamento ocorreu com poucos erros de classificação (4 erros em 70 amostras) atingindo a mesma eficiência do conjunto de genes selecionados no trabalho original referente à este conjunto de amostras, publicado por Talantov *et al.*, (2005). Isto indica que um sistema de *scores* baseado na assinatura de expressão de *MMPs*, *TIMPs* e *RECK* pode ser útil na diferenciação entre melanoma maligno e *nevi* benignos, que representa um problema de diagnóstico bastante comum.

Em melanomas, *MMP-2*, *MMP-9* e *MT1-MMP*, alvos moleculares clássicos de *RECK* (TAKAHASHI *et al.*, 1998; OH *et al.*, 2001), são associados com maior agressividade e pior prognóstico (HOFMANN *et al.*, 2002). Além disto, as mutações em *NRAS* ou *BRAF*, funcionalmente redundantes ao tornar a via das quinases ativadas por mitógenos (*mitogen-activated protein kinases* – MAPK) constitutivamente ativa, estão presentes em cerca de 80% dos melanomas (DAVIES *et al.*, 2002). Uma vez que *RECK* é silenciado por esta via de sinalização (TAKAHASHI *et al.*, 1998; SASAHARA *et al.*, 1999a; SASAHARA *et al.*, 2002) e que seus alvos moleculares mais bem descritos são importantes na biologia do melanoma, é notável a escassez de estudos que descrevam o envolvimento deste supressor tumoral nos processos patológicos deste tipo de tumor. Esta lacuna foi preenchida no presente trabalho, no qual são apresentados os dados referentes à primeira descrição do perfil de expressão de *RECK* em amostras clínicas de melanoma (FIGURA 14). O que se



observa é que a expressão de *RECKA* (que é a única isoforma do transcrito de *RECK* representada nesta plataforma de microarranjo) encontra-se silenciada em amostras de melanomas malignos quando comparadas com amostras de tecidos normais e *nevi* benignos. Interessante ressaltar aqui, que os níveis deste transcrito não são significativamente diferentes entre amostras de melanoma primário e de melanoma metastático, como mostrado na FIGURA 17. Isto indica que o silenciamento de *RECKA* é um dos eventos iniciais na transformação maligna do melanócito. Um dos motivos para este comportamento é que o silenciamento do gene *RECK* está associado à sinalização de oncogenes como Ras (TAKAHASHI *et al.*, 1998), relacionados à transformação, e mutações nestes oncogenes ocorrem nos primeiros estágios da transformação maligna do melanoma (GRAY-SCHOPFER *et al.*, 2007).

A análise dos perfis de expressão de MMPs e de TIMPs nas amostras reunidas por Talantov *et al.* mostra, ainda, que a transformação maligna dos melanócitos envolve o silenciamento do gene *TIMP3* e a ativação da transcrição de *TIMP2* e *MMP14* (*MT1MMP*) (FIGURA 14). O papel dos inibidores teciduais de metaloproteases em tumores é controverso. Além de inibirem a proteólise da MEC e, portanto, dificultarem processos invasivos, algumas TIMPs podem atuar como fatores de crescimento, favorecer a proliferação celular, inibir a apoptose ou mesmo atuar como ativadores de MMPs (STETLER-STEVENSON, 2008; MURPHY, 2011). *TIMP-2* representa um exemplo desta divergência de papéis, ao ligar *MMP-2* para inibir sua atividade, ao mesmo tempo que atua como um componente no complexo de ativação de pró-*MMP-2*, juntamente com *MT1-MMP*. Em nossa análise dos dados de microarranjo, observamos que, além de *TIMP2* e *MT1MMP* estarem mais expressos em melanomas malignos quando comparados com amostras não-malignas, há uma correlação direta significativa entre os perfis de expressão dos dois genes, observada de forma consistente tanto no painel de amostras reunidas por Talantov *et al.* (FIGURA 13) quanto no reunido por Xu *et al.* (FIGURA 16). Isto representa um indício de que os dois genes são co-regulados no sentido de aumentar a capacidade de ativação de pró-*MMP-2* com a progressão do melanoma. O aumento na conversão de pró-*MMP-2* para sua forma madura representa um maior potencial proteolítico do tumor, mesmo que os níveis de expressão de *MMP2* nas amostras de melanoma maligno sejam significativamente mais baixos do que nas amostras de tecidos normais e *nevi* benignos (ver Apêndice). Isto pode ser explicado pelo fato de que grande parte da pró-*MMP-2* presente no microambiente do melanoma é secretada pelas células do

estroma (HOFMANN *et al.*, 2005a). Por fim, a correlação entre os níveis séricos de TIMP-2 e um mau prognóstico para pacientes de melanoma foi demonstrada por Yoshino *et al.* (2008), corroborando nossos dados e indicando que a maior expressão de *TIMP2* pode ser associada à uma maior agressividade de melanomas.

TIMP-3, por outro lado, é predominantemente associado a um fenótipo menos agressivo de tumores. A superexpressão deste gene em melanoma induziu a apoptose e reduziu o tamanho de implantes xenográficos em camundongos (AHONEN *et al.*, 1998; AHONEN *et al.*, 2003). Além disto, os pulmões e ossos de camundongos *TIMP3*<sup>-/-</sup> foram mais suscetíveis à colonização por melanomas metastáticos (CRUZ-MUNOZ *et al.*, 2006). A análise realizada no presente estudo indica o silenciamento deste gene em melanomas malignos (FIGURA 14) e, de forma interessante, um aumento na sua expressão em amostras de melanoma metastático quando comparado a amostras de melanomas primários (FIGURA 17). Este aumento na expressão de *TIMP3* em estágios avançados do melanoma já foi observado anteriormente por Airola *et al.* (1999), que atribuiu o fato à uma resposta do hospedeiro à maior atividade proteolítica do melanoma.

Da mesma forma que os perfis de expressão de *TIMP2* correlacionam com os de *MT1MMP*, os níveis de *RECKA* e de *TIMP3* também apresentaram correlação direta estatisticamente significativa (FIGURA 13 e FIGURA 16). Um dos possíveis fatores envolvidos na co-regulação destes dois genes foi identificado no estudo conduzido por Gabriely *et al.* (2008), que demonstrou o silenciamento de *RECKA* e de *TIMP3* por miR-21 em linhagens celulares de gliomas, e efeito semelhante foi descrito por Wang *et al.* (2013) em modelo de carcinoma de esôfago. Além disto, a correlação inversa entre *RECKA* e *MT1MMP* sugere que os fatores envolvidos no silenciamento de um gene estão relacionados ao aumento da expressão do outro, resultando numa regulação oposta. De fato, a sinalização desencadeada pela ativação da via MAPK pode promover o silenciamento do gene *RECK* (TAKAHASHI *et al.*, 1998; SASAHARA *et al.*, 1999b; SASAHARA *et al.*, 2002) e estimular a expressão de diversas MMPs, incluindo *MT1MMP* (DONG *et al.*, 2010). Por fim, as correlações entre perfis de expressão de MMPs e inibidores em amostras clínicas, apresentadas neste trabalho, foram consistentes com as correlações observadas em um painel de linhagens de melanoma humano reunido durante um estudo anterior conduzido por nosso grupo, no qual os perfis de expressão foram determinados por PCR em tempo real (ver Apêndice) (JACOMASSO, 2010; JACOMASSO *et al.*, 2014).

Com base nesta rede de interações, questionamos se a expressão de *RECKA* poderia ser utilizada como referência quanto à expressão de marcadores de malignidade de melanomas já descritos. Verificamos que amostras com maior expressão residual de *RECKA* possuem menor expressão de *TIMP2* e de *MT1MMP*, além de uma maior expressão de *TIMP3* (FIGURA 18). Este perfil foi observado em ambos os conjuntos de amostras analisados sendo, portanto, consistentes em amostras completamente independentes. Com base nisto, sugerimos que a avaliação da expressão de *RECKA* possa servir como um componente de um método de diagnóstico e de predição do prognóstico de indivíduos com melanoma.

A sonda que representa o gene *RECK* nestes microarranjos possui sequência complementar ao éxon 9 do transcrito *RECKA* e, portanto, não hibridiza com *RECKB* ou *RECKD*, transcritos alternativos daquele gene. Desta forma, os perfis demonstrados acima podem ser associados exclusivamente ao transcrito canônico. Uma vez que os transcritos alternativos não são representados nas plataformas de microarranjo mais comuns, não foi possível analisar a expressão de *RECKB* e *RECKD* em melanomas por este método. Porém, em um trabalho anterior desenvolvido em nosso laboratório, utilizou-se PCR quantitativa em tempo real e um painel de linhagens de melanoma humano para avaliar a expressão dos transcritos canônico e alternativos de *RECK*. Naquele trabalho foi observado que a razão *RECKB/RECKA* é maior em linhagens de melanoma derivadas de metástases (JACOMASSO, 2010). Além disto, outros trabalhos realizados por nosso grupo mostram que o tratamento com sinvastatina, um fármaco com ação antitumoral, reduz a viabilidade de gliomas e de melanomas, com a concomitante redução nos níveis de *RECKB* (BARBOSA, 2010; KENSKI, 2013). Com base nestas informações, buscou-se identificar os mecanismos pelos quais a razão *RECKB/RECKA* pode ser regulada em melanoma, bem como esclarecer os processos celulares nos quais *RECKB* pudesse estar envolvido.

A proteína *RECKA* é ligada à membrana plasmática pela modificação da porção C-terminal por uma molécula de glicosilfosfatidilinositol (GPI) (TAKAHASHI *et al.*, 1998). Este tipo de modificação favorece a partição destas proteínas para microdomínios da membrana, ricos em colesterol, conhecidas como *lipid rafts* (VARMA e MAYOR, 1998). No caso de *RECKA*, foi demonstrado por Miki *et al.* (2007) que sua localização nestes microdomínios é necessária para que ocorra a inibição da ativação de pró-MMP-2 mediada por MT1-MMP. A análise da sequência de aminoácidos predita para *RECKB* indica que a sua porção C-terminal, codificada pelo

éxon 9 alternativo, possui um motivo associado à modificação por GPI (TROMBETTA-LIMA, dados não publicados). Desta forma, RECKB pode estar presente em *lipid rafts*, compartilhando este microambiente com RECKA. Além disto, sabe-se que RECKA é capaz de formar homodímeros (OMURA *et al.*, 2009). As regiões envolvidas nesta dimerização não são conhecidas. Porém, em nossa análise da sequência de aminoácidos comum entre RECKA e RECKB, foi encontrada uma região com 80% de homologia com um motivo denominado de *zona pellucida domain*, ou *ZP domain* (TABELA 5), associado à polimerização de proteínas extracelulares ligadas à membranas por âncoras de GPI (JOVINE *et al.*, 2002). Este domínio pode estar envolvido tanto na homodimerização de RECKA como na possível formação de heterodímeros de RECKA e RECKB, facilitados pelo enriquecimento destas moléculas nos *lipid rafts*. Sendo assim, RECKB poderia interferir positiva ou negativamente nos processos mediados por RECKA.

Para se verificar o envolvimento de RECKA e RECKB em melanomas, foram geradas linhagens nas quais a expressão de *RECKA* ou *RECKB* são silenciadas por RNA de interferência (RNAi). Também foram geradas linhagens que superexpressam *RECKB<sup>orf</sup>*, com o objetivo de esclarecer o papel da proteína RECKB predita. As linhagens foram obtidas utilizando construções lentivirais, capazes de integrar as sequências ao genoma das células de interesse, fazendo com que as modificações induzidas sejam mantidas durante a proliferação das células.

Uma vez que RECKA é descrito como um regulador negativo de MMP-2, MMP-9 e MT1-MMP (TAKAHASHI *et al.*, 1998; OH *et al.*, 2001), podendo, inclusive, inibir a transcrição de *MMP9* (TAKAGI *et al.*, 2009), as expressões dos mRNAs destas MMPs e de seus inibidores, *TIMP1*, *TIMP2* e *TIMP3* foram quantificadas nas linhagens derivadas da linhagem 1205Lu. É interessante notar que a superexpressão de *RECKB<sup>orf</sup>* promoveu alterações no perfil de expressão que são análogas à alteração associada à transformação do melanócito, observada na análise dos microarranjos (seção 6.1), na qual há aumento de expressão de *MT1MMP* e de *TIMP2* em lesões malignas, com concomitante redução da expressão de *TIMP3* (FIGURA 27). *RECKB<sup>orf</sup>* também induziu a expressão do mRNA de *TIMP1* e de *MMP9*, transcritos cujo aumento foi observado em melanomas malignos quando comparados às amostras benignas analisadas nos microarranjos (ver Apêndice). Apesar de não haver descrição sobre a capacidade de RECKA de modular a expressão de *TIMP1*, *TIMP2*, *TIMP3* e *MT1MMP*, sabe-se que RECKA inibe a transcrição de *MMP9*, através da

diminuição da ligação dos fatores de transcrição Fra-1 e c-Jun ao promotor de *MMP9* (TAKAGI *et al.*, 2009), e que estes genes possuem elementos em seus promotores que poderiam responder aos mesmos sinais que o promotor de *MMP9*. Porém, Takagi *et al.* (2009), ao descrever o efeito de RECKA sobre a transcrição de *MMP9*, verificou que os níveis de *MMP2*, cuja região promotora compartilha vários elementos com a outra gelatinase, não eram modulados por esta proteína. Em nossos dados, a superexpressão de RECKB também não foi capaz de modular os níveis de mRNA de *MMP2*. Este fato sugere que a isoforma alternativa, RECKB, possa atuar nas mesmas vias em que atua RECKA, porém com função antagônica à proteína canônica.

O fato de a superexpressão de *RECKB<sup>orf</sup>* ser capaz de regular a expressão gênica de MMPs e TIMPs chama a atenção devido ao fato de a proteína RECKB predita, assim como a canônica, não possuir nenhuma região transmembrana, não apresentando domínios intracelulares capazes de transmitir sinais diretamente através da membrana plasmática. Hong *et al.*, demonstraram que RECK interage fisicamente com Her2/Neu (HONG *et al.*, 2011), inibindo sua dimerização e ativação, promovendo a redução da transcrição de *MMP9* e de outros genes regulados por este receptor. A dimerização destes receptores, que permite a ativação pela fosforilação cruzada dos resíduos de tirosina de cada subunidade, pode ser inibida por peptídeos contendo motivos do tipo nó de cisteína (BEREZOV *et al.*, 2002). A porção N-terminal de RECKA possui cinco motivos deste tipo, enquanto RECKB possui somente três (FIGURA 6). Isto pode ser um indício de que a interação de RECKA com Her-2/Neu depende das regiões contendo estes motivos e que RECKB, que seria ineficiente em promover a inibição, atenuaria o efeito de RECKA.

A ausência, em RECKB, de dois dos motivos do tipo nó de cisteína presentes na forma canônica, junto com o fato de a isoforma alternativa ser capaz de induzir a expressão de *MMP9*, em efeito antagônico ao descrito para RECKA, poderia sugerir um papel de dominante negativo para esta isoforma. Porém, na linhagem de melanoma 1205Lu, o silenciamento de *RECKA* não gerou efeito análogo ao da superexpressão de RECKB sobre os níveis de mRNA de *MMP9* e dos outros genes modulados (FIGURA 26), tornando esta hipótese menos provável. Assim, dois cenários são capazes de explicar os aumentos de expressão promovidos por RECKB como observados neste estudo: (a) RECKB atua de forma completamente independente de RECKA, ou (b) RECKB e RECKA são ambos necessários para que haja modulação da expressão de *MT1MMP*, *MMP9*, *TIMP1*, *TIMP2* e *TIMP3*. Os

requisitos da hipótese (b) seriam cumpridos no caso de um heterodímero de RECKA e RECKB influenciar na sinalização de receptores de uma maneira que os componentes isolados não seriam capazes. A confirmação da formação de heterodímeros de RECKA e de RECKB deverá ser objeto de outros estudos.

Os efeitos antagônicos de RECKA e de RECKB vão além da regulação transcricional de *MMP9*. Apesar de RECKA e RECKB não terem modulado a ativação de pró-MMP-2 nas linhagens analisadas, os ensaios de zimografia em gelatina sugerem que a conversão de pró-MMP-9 para MMP-9 madura, induzida pela presença de matrigel®, é inibida com o silenciamento de *RECKB* e estimulada com o silenciamento de *RECKA* na linhagem 1205Lu (FIGURA 28).

Os mecanismos descritos pelos quais RECKA regula MMP-9 são: inibição transcricional (TAKAGI *et al.*, 2009), inibição da secreção e inibição da atividade (TAKAHASHI *et al.*, 1998) proteolítica. Não há, porém, estudos demonstrando claramente que RECKA iniba a conversão de pró-MMP-9 para sua forma madura. No ambiente extracelular esta conversão é catalisada por certas MMPs, especificamente MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-7, MMP-10 e MMP-13 (VAN DEN STEEN *et al.*, 2002). Destas MMPs, sabe-se RECKA é capaz de inibir pelo menos duas: MMP-2 (OH *et al.*, 2001) e MMP-7 (OMURA *et al.*, 2009). Assim, o silenciamento de RECKA poderia liberar estas MMPs da repressão, permitindo a clivagem do pró-peptídeo da pró-MMP-9 e consequente ativação. A inibição da secreção e da atividade catalítica de MMP-9, e possivelmente de MMP-2, foi descrita como dependente dos motivos semelhantes à serina-proteases do tipo Kazal, presentes na forma canônica de RECK (CHANG *et al.*, 2008). A ausência destes domínios em RECKB pode ser o fator determinante para que esta isoforma favoreça a ativação de pró-MMP-9. De fato, a superexpressão de *RECKB<sup>orf</sup>* na linhagem WM35 parece deslocar a relação MMP-9/pró-MMP-9 no sentido da forma madura (FIGURA 28B), o que colocaria a isoforma RECKB em um papel oposto ao de RECKA também na regulação da atividade de MMPs. De forma intrigante, a superexpressão de *RECKB<sup>orf</sup>* não promoveu aumento detectável na conversão de pró-MMP-9 na linhagem 1205Lu (FIGURA 28A). Isto pode ser um efeito do *background* genético de cada linhagem parental utilizada. Em um estudo anterior conduzido por nosso grupo, a linhagem 1205Lu foi identificada como possuindo a maior razão *RECKB/RECKA* em um painel de linhagens de melanoma humano, enquanto a linhagem WM35 apresentava a razão mais baixa dentre todas do painel (JACOMASSO, 2010). Desta forma, a superexpressão de *RECKB<sup>orf</sup>* na linhagem

1205Lu pode ser redundante no que diz respeito à ativação de MMPs, enquanto na linhagem WM35 a expressão basal de *RECKB* estaria mais distante da saturação.

Contudo, a aparente modulação da ativação de pró-MMP-9 induzida pelo silenciamento de *RECKA* ou *RECKB* não foi suficiente para aumentar a taxa de invasão através de matrigel® das células da linhagem 1205Lu em relação ao controle (FIGURA 30 FIGURA 31). Nas mesmas condições experimentais, as células da linhagem WM35 que superexpressavam *RECKB<sup>orf</sup>* não foram capazes de invadir o matrigel® (dados não mostrados). Além disto, a modulação dos níveis dos transcritos do gene *RECK* não foi capaz de alterar a capacidade das células de formar colônias suspensas em agarose (FIGURA 32 e FIGURA 33). Os estudos relacionando RECK com a capacidade de proliferação livre de adesão são escassos. Lee *et al.* (2013) observaram que células da linhagem HEK293 (células renais embrionárias humanas) transfectadas com siRNA específicos para *RECKA* (sequências homólogas aos éxons 11 e 21 do transcrito canônico, incapazes de inibir os transcritos alternativos) foram capazes de formar, suspensas em agarose, colônias maiores e em maior número do que as transfectadas com siRNA controle. Este resultado, porém, utiliza uma célula não tumoral, e originada de um tecido com características distintas do melanócito, o que pode explicar a ausência de efeitos detectáveis em nosso experimento utilizando linhagens de melanoma.

O antagonismo de *RECKB* sobre *RECKA* na regulação de MMPs pode ter profundas implicações sobre a forma como entendemos o papel do gene *RECK*. Suas funções descritas no desenvolvimento embrionário e angiogênese (OH *et al.*, 2001; YAMAMOTO *et al.*, 2012), e em processos celulares diversos, como proliferação e senescência (KITAJIMA *et al.*, 2011; YOSHIDA *et al.*, 2011), e migração (MORIOKA *et al.*, 2009), além da supressão da metástase em diversos tipos de tumores (revisados por Nagini (2012)), são creditados à regulação negativa de MMPs, e da consequente estabilização dos componentes da MEC. Esta estabilização promovida por *RECKA* foi associada à atenuação da ativação do receptor de fator de crescimento epidermal (*epidermal growth factor receptor* – EGFR) (KITAJIMA *et al.*, 2011) e da ativação de integrinas ligantes de colágeno (MIKI *et al.*, 2010; YOSHIDA *et al.*, 2011). Estes efeitos são dependentes da regulação negativa exercida por *RECKA* sobre MMPs. A inclusão de um antagonista como *RECKB* nesta rede de interações de *RECKA* adiciona outro nível de complexidade à compreensão destes processos. Isto porque *RECKB* é codificado pelo mesmo gene, e sua transcrição está submetida aos

mesmos estímulos e inibidores que o transcrito canônico. Desta forma, os mecanismos descritos até aqui para a regulação transcricional de *RECK* não são suficientes para explicar a regulação da razão *RECKB/RECKA* observada em estudos anteriores conduzidos por nosso grupo.

Uma vez que a razão *RECKB/RECKA* é claramente modulada na progressão de melanomas (JACOMASSO, 2010), e que responde à tratamentos antitumorais (BARBOSA, 2010; AMSTALDEN, 2011; KENSKI, 2013), buscamos, neste estudo, identificar vias de transdução de sinais envolvidas na regulação desta razão. Para este fim, os mRNA de *RECKA* e de *RECKB* foram quantificados na linhagem de melanoma metastático 1205Lu após a inibição farmacológica de fosfoinositídeo-3-quinase (PI3K), Akt, proteína quinase C (PKC), proteína quinase associada a Rho (ROCK) e de MEK1/2, um componente chave da via MAPK (FIGURA 35). As vias de sinalização que envolvem estes mediadores encontram-se, com frequência, desreguladas em diversos tipos de tumores (SHAW e CANTLEY, 2006; DENNING, 2012; AMIN *et al.*, 2013).

Sabe-se que o gene *RECK* é silenciado por Ras (TAKAHASHI *et al.*, 1998; SASAHARA *et al.*, 1999a; SASAHARA *et al.*, 2002), através da via das MAPK, e que este silenciamento ocorre por diversos mecanismos de regulação transcricional, como inibição de fatores de transcrição (SASAHARA *et al.*, 2002; HSU *et al.*, 2006), modificação de histonas (LIU *et al.*, 2003; CHANG *et al.*, 2004), além de metilação do promotor (CHANG *et al.*, 2006), que não ocorre em melanomas (LIU *et al.*, 2008a). Além disto, a inibição de PI3K por LY294002 já foi associada ao aumento dos níveis de mRNA de *RECK* em fibroblastos murinos (HATTA *et al.*, 2009).

Nos dados apresentados neste trabalho, observamos que a inibição promovida pelo fármaco U0126 sobre MEK1/2, quinases *downstream* de Ras, que ativam ERK1/2 na via das MAPK, deslocou a razão *RECKB/RECKA* no sentido do favorecimento da formação e/ou estabilização do transcrito alternativo *RECKB* sem promover alterações nos níveis do transcrito canônico. Por outro lado, a inibição de PI3K pelo fármaco LY294002 promoveu aumento específico do transcrito canônico, sem alterar os níveis de *RECKB* (FIGURA 35). É importante mencionar que a linhagem de melanoma metastático humano utilizada nestes testes, 1205Lu, apresenta ativação constitutiva de ambas as vias, induzidas pela presença da mutação V600E em B-Raf (SATYAMOORTHY *et al.*, 1997), que ativa MEK1/2, e pela deleção de *PTEN* (PARAISO *et al.*, 2011), o que prolonga a meia-vida de



fosfoinosítido-(3,4,5)-trifosfato (PI(3,4,5)P<sub>3</sub> ou PIP<sub>3</sub>) gerado por PI3K, promovendo exacerbação da sua sinalização. Este fato é ilustrado no estudo conduzido por Smalley *et al.* (2006), no qual foi verificado que o tratamento de células da linhagem 1205Lu com os fármacos U0126 + LY294002 apresentava efeito aditivo sobre a diminuição da viabilidade de células aderidas, quando comparado ao tratamento com cada fármaco separadamente. Desta forma, é interessante o fato de os transcritos canônico e alternativo do gene *RECK* serem regulados independentemente, por PI3K e por MAPK, respectivamente.

O aumento de PI(3,4,5)P<sub>3</sub> promovido por PI3K induz a atividade de PDK1 (quinase dependente de 3-fosfoinosítido 1). Esta quinase está envolvida na ativação de diversas proteínas transdutoras de sinais intracelulares. Uma destas proteínas é Akt, um importante alvo *downstream* de PI3K na promoção do crescimento e sobrevivência da célula. Curiosamente, o fármaco Triciribine, um inibidor da fosforilação de Akt, possui um efeito distinto do observado para a inibição de PI3K. A incubação das células com este fármaco promoveu um aumento discreto, porém estatisticamente significativo, nos níveis de mRNA de *RECKB*, sem induzir alterações significativas na expressão do mRNA de *RECKA* (FIGURA 35). Os níveis proteicos de RECKA, por outro lado, foram reduzidos após a incubação das células com Triciribine, indicando que Akt pode modular a tradução e/ou a estabilidade da proteína canônica. Isto indica que PI3K regula os níveis de *RECKA* através de outros mediadores ativados por PI(3,4,5)P<sub>3</sub>. Um destes outros mediadores é a proteína Rho (SHAW e CANTLEY, 2006), uma GTPase da superfamília de Ras, envolvida na regulação do citoesqueleto, adesão e motilidade das células. A ativação de Rho promove a ativação de ROCK, que por sua vez está envolvido em diversos processos patológicos humanos, dentre eles o câncer (AMIN *et al.*, 2013). A inibição de ROCK pelo fármaco Y27632, porém, não teve efeito sobre a expressão de *RECKA* ou *RECKB* (FIGURA 35). Por fim, PDK1 pode ativar quinases da família PKC, estas sendo, portanto, outros possíveis intermediadores da sinalização de PI3K. PKC é o principal mediador dos efeitos proliferativos dos ésteres de forbol, de particular importância em melanoma (DENNING, 2012). Além de PDK1, moléculas pequenas e íons, como diacilgliceróis e Ca<sup>2+</sup>, podem ativar PKC, que uma vez ativa fosforila diversas proteínas sinalizadoras na célula, incluindo ERK1/2 e STAT3, ambas envolvidas na proliferação e sobrevivência de células tumorais (DENNING, 2012). O tratamento com GF109203X, um inibidor de várias isoformas de PKC, promoveu redução nos níveis de *RECKB* em

relação ao controle, sem modificar os níveis de *RECKA*, em efeito distinto do observado por PI3K (FIGURA 35). Assim, o mediador *downstream* de PI3K envolvido na indução de *RECKA* não foi identificado.

A regulação assimétrica os níveis dos transcritos *RECKA* e *RECKB* verificada com a inibição de MAPK, PI3K e PKC não pode ser explicada somente pela regulação transcricional. Portanto, a regulação diferencial entre *RECKA* e *RECKB* por estes inibidores pode estar relacionada à mecanismos de regulação co- ou pós-transcricionais. Uma vez que os transcritos do gene *RECK* são resultantes de *splicing* alternativo, uma das possíveis formas de regulação diferencial de *RECKA* e *RECKB* é a indução da retenção do éxon 9 de *RECKB* durante o processamento do pré-mRNA de *RECK*. Os reguladores de *splicing* mais bem estudados pertencem à família das proteínas ricas em serina e arginina (SR). Estas proteínas SR ligam-se à sítios exônicos indutores de *splicing* (*exonic splicing enhancers* – ESE), favorecendo a montagem do spliceossomo e, portanto, a inclusão do éxon no qual o ESE está contido. Uma vez que as sequências consenso de *splicing* e os ESE apresentam alta variabilidade, podem ocorrer ESE com maior ou menor afinidade por determinadas proteínas SR. Esta afinidade, por fim, pode ser modulada de diversas formas, de acordo com os sinais ativos na célula e com a ligação de outros fatores ao pré-mRNA, resultando na inclusão ou não de um determinado éxon (DAVID e MANLEY, 2010).

Neste trabalho utilizamos a ferramenta de análise de sequências ESEFinder para identificar possíveis ESE presentes no nono éxon de *RECKB* ou de *RECKA* (FIGURA 37). A análise revelou a presença de um sítio de ligação de SRSF1 mais forte no éxon 9 de *RECKB* do que no éxon 9 de *RECKA*. Desta forma, SRSF1 é um candidato à exercer a regulação diferencial da razão *RECKB/RECKA* observada neste e em outros estudos conduzidos por nosso grupo (BARBOSA, 2010; JACOMASSO, 2010; AMSTALDEN, 2011; KENSKI, 2013), induzindo a formação preferencial de *RECKB*, em detrimento da forma supressora tumoral *RECKA*. A análise do transcriptoma de células HeLa depositado por Saltzman *et al.* (2011), sequenciado após o silenciamento de SRSF1 por RNA de interferência, confirmou a capacidade deste regulador de *splicing* de alterar a razão *RECKB/RECKA* (TABELA 6). Este é um dado interessante, uma vez que *SRSF1* é um proto-oncogene, e sua superexpressão foi suficiente para transformar fibroblastos murinos imortalizados em células malignas (KARNI *et al.*, 2007). Além disso, SRSF1 é um alvo do oncogene Myc, e induz a transformação de células epiteliais de mama (ANCZUKOW *et al.*, 2012; DAS *et al.*,

2012). Estes efeitos são associados ao favorecimento da formação isoformas de *splicing* com função pró-tumoral, em detrimento de isoformas com potencial supressor de tumor (TROMBETTA-LIMA *et al.*, 2013). Alguns exemplos incluem a inclusão do éxon 8a no mRNA de VEGF em tumores, induzindo a forma pró-angiogênica (ROBINSON e STRINGER, 2001), e a indução de Bcl-X<sub>L</sub>, uma isoforma que inibe a apoptose, antagonizando Bcl-X<sub>S</sub>, pró-apoptótica (SCHWERK e SCHULZE-OSTHOFF, 2005). Diversas proteínas sinalizadoras modulam a atividade de SRSF1, incluindo as inibidas neste estudo (seção 6.3.1) (WEG-REMERS *et al.*, 2001; BLAUSTEIN *et al.*, 2005; AUBOEUF *et al.*, 2012). Akt, em particular, é um dos reguladores clássicos de SRPK1, um ativador de proteínas da família SR (BLAUSTEIN *et al.*, 2005; ZHOU e FU, 2013)

Uma vez estabelecido que SRSF1 é capaz de promover o aumento da razão *RECKB/RECKA* em modelo de câncer cervical, verificamos se a expressão deste modulador de *splicing* sofre alterações significativas durante a progressão do melanoma primário para a metástase. Utilizando os painéis de amostras depositados por Talantov *et al.* (2005) e Xu *et al.* (2008) observamos que a transformação dos tecidos benignos em melanoma maligno, assim como a progressão de tumor primário para a metástase, são eventos que promovem aumentos na expressão de SRSF1 (FIGURA 38), corroborando nosso modelo de que a modulação da razão *RECKB/RECKA* em melanomas metastáticos se deve ao favorecimento da inclusão do éxon 9 de *RECKB*, em detrimento da formação do transcrito canônico.

Por fim, consideramos outro mecanismo pelo qual os níveis de *RECKA* e *RECKB* podem ser modulados de forma diferencial: a regulação por micro RNAs (miRNA). Estes pequenos RNAs não-codificantes estão envolvidos na regulação pós-transcricional, mediada por proteínas da família Argonaut (Ago). Estas proteínas catalisam a clivagem, ou impedem a tradução, de mRNAs cuja sequência seja complementar ao microRNA (BARTEL, 2009).

Diversos miRNAs possuem *RECKA* como alvo. Em geral, os miRNA capazes de silenciar RECK são os chamados “oncomirs”, por serem associados à transformação maligna e à maior agressividade de tumores. Gabriely *et al.* (2008) demonstrou que miR-21, o principal oncomir conhecido, envolvido em diversos tipos de tumores, silencia RECK e TIMP-3, promovendo aumento da invasividade de gliomas. Loayza-Puch *et al.* (2010) demonstrou que a expressão de RECK em linhagens murinas é inibida por miR-21, que por sua vez é induzido por Ras. RECK

também é inibido por miR-15b/16 e miR-372/373 (LOAYZA-PUCH *et al.*, 2010). Mais recentemente vários outros miRNAs vem sendo associados ao silenciamento de RECKA (CHIANG *et al.*, 2013; LIN *et al.*, 2013; XIN *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2013; QIN e LUO, 2014; ZHAO *et al.*, 2014). Uma vez que o mecanismo deste silenciamento envolve sequências normalmente presentes na região 3'-UTR dos mRNAs, a regulação por estes miRNAs descritos para RECKA não se aplicam, necessariamente, à RECKB. Portanto, a regulação mediada por micro RNAs poderia ser outro fator envolvido na regulação independente de RECKA ou RECKB.

A análise da sequência do mRNA de *RECKB* retornou alguns possíveis sítios complementares à micro RNAs conhecidos (TABELA 7). Destes, apenas a região correspondente à sequência de miR-23a é compartilhada com o transcrito canônico, por ser codificada nos oito primeiros éxons. Os demais sítios de miRNA identificados encontram-se na região 3'-UTR, presente somente nos transcritos *RECKB* e *RECKD*. Uma vez que o silenciamento destes transcritos por estes miRNAs não foi comprovada experimentalmente, não é possível afirmar seu envolvimento na modulação da razão *RECKA/RECKB* induzida pelas vias de sinalização oncogênicas. Apesar disto, Hidaka *et al.* (2012) observou que a expressão de miR-1285, um dos miRNA que possivelmente tem *RECKB* como alvo, é silenciada em carcinomas de células renais, e que este miRNA tem como alvos genes envolvidos na proliferação e invasão de tumores. Outro dos miRNAs listados na TABELA 7, miR-1304, foi identificado como silenciado pela expressão de Bcl-X<sub>L</sub>, um fator anti-apoptótico bastante expresso em diversos tumores e tem como alvos proteínas regulatórias das vias PI3K/Akt, MAPK, TGFβ, entre outras (OTHMAN *et al.*, 2013). O fato de os transcritos alternativos do gene *RECK* serem alvos de miRNA supressores tumorais sugere que estes transcritos possuem função pró-tumoral, e que a perda destes mecanismos de manutenção pode promover agressividade, em parte, devido ao aumento da expressão destas isoformas.

Em conjunto, nossos dados mostram que o gene *RECK* possui papel importante em melanoma, assim como em diversos outros tumores. Seu perfil de expressão em melanomas é semelhante ao observado para diversas neoplasias, no sentido em que encontra-se em níveis mais baixos que em tecidos normais. A expressão residual alta também parece um indicativo de um tumor com perfil associado à menor agressividade. Além disto, fica evidenciada a complexidade do papel deste gene, que codifica diversos transcritos, pelo menos um dos quais com

função antagônica ao do transcrito canônico. A identificação destes transcritos e a descrição do seu papel requerem uma revisão no nosso entendimento de *RECK* como um gene supressor de tumor, uma vez que um outro produto deste gene, *RECKB* apresenta vários indícios de ser um promotor de agressividade, ao estimular a expressão e a ativação de *MMP9*. Além disto, a regulação oposta destes genes, modulada por vias oncogênicas que favorecem a formação de *RECKB*, em detrimento de *RECKA*, são um forte indicativo do papel oposto destes dois transcritos. Apesar de ainda não ter ficado clara a natureza da interação entre os produtos proteicos de *RECKB* e *RECKA*, este trabalho serve como base para futuros estudos da função de *RECKB* em outros contextos fisiológicos e patológicos.

## 8 CONCLUSÕES

- RECKA é silenciado durante a formação do melanoma e sua expressão correlaciona com uma menor expressão de MT1-MMP e TIMP-2, relacionadas com a ativação de MMP-2;
- A superexpressão de *RECKB* induz a expressão de *MT1MMP*, *TIMP2* e *MMP9*, o que correlaciona com amostras clínicas de maior agressividade;
- RECKB parece promover a conversão das pró-MMPs em suas formas ativas;
- A razão *RECKB/RECKA* é modulada por sinalização oncogênica mediada pelas vias MAPK e PI3K;
- O splicing do transcrito primário do gene *RECK* é modulado por SRSF1, que favorece a formação dos transcritos alternativos em detrimento do canônico;
- *RECKB* pode ser alvo de miRNA relacionados à supressão tumoral.

## REFERÊNCIAS

- AHONEN, M., BAKER, A. H., KAHARI, V. M. Adenovirus-mediated gene delivery of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 inhibits invasion and induces apoptosis in melanoma cells. **Cancer research**, v. 58, n. 11, p. 2310-5, 1998.
- AHONEN, M. *et al.* Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 induces apoptosis in melanoma cells by stabilization of death receptors. **Oncogene**, v. 22, n. 14, p. 2121-34, 2003.
- AIROLA, K. *et al.* Expression of collagenases-1 and -3 and their inhibitors TIMP-1 and -3 correlates with the level of invasion in malignant melanomas. **British journal of cancer**, v. 80, n. 5-6, p. 733-43, 1999.
- AMERICAN CANCER SOCIETY (ACS). **Melanoma Skin Cancer**. Disponível em <http://www.cancer.org/acs/groups/cid/documents/webcontent/003120-pdf.pdf>. Acesso em 13/02/2014
- AMIN, E. *et al.* Rho-kinase: regulation, (dys)function, and inhibition. **Biological chemistry**, v. 394, n. 11, p. 1399-410, 2013.
- AMSTALDEN, H. G. **Efeitos da Quercetina em Células de Glioma Humano: Envolvimento de Metaloproteínas de Matriz e seus Inibidores**. Curitiba. 133 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.
- ANCZUKOW, O. *et al.* The splicing factor SRSF1 regulates apoptosis and proliferation to promote mammary epithelial cell transformation. **Nature structural & molecular biology**, v. 19, n. 2, p. 220-8, 2012.
- AUBOEUF, D. *et al.* Alternative splicing and cancer. **Journal of nucleic acids**, v. 2012, p. 363809, 2012.
- BARBOSA, F. A. L. **Efeito da Simvastatina na Modulação da Expressão de RECK e suas Isoformas em Células de Melanoma Humano**. Curitiba. 103 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. **Cell**, v. 136, n. 2, p. 215-33, 2009.
- BASBAUM, C. B., WERB, Z. Focalized proteolysis: spatial and temporal regulation of extracellular matrix degradation at the cell surface. **Current opinion in cell biology**, v. 8, n. 5, p. 731-8, 1996.
- BATES, D. O. *et al.* VEGF165b, an inhibitory splice variant of vascular endothelial growth factor, is down-regulated in renal cell carcinoma. **Cancer Res**, v. 62, n. 14, p. 4123-31, 2002.

BEREZOV, A. *et al.* Disabling receptor ensembles with rationally designed interface peptidomimetics. **J Biol Chem**, v. 277, n. 31, p. 28330-9, 2002.

BERGER, M. F. *et al.* Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations. **Nature**, v. 485, n. 7399, p. 502-6, 2012.

BERGER, M. F. *et al.* Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations. **Nature**, v. advance online publication, 2012.

BLACK, D. L. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. **Annual review of biochemistry**, v. 72, p. 291-336, 2003.

BLANKENBERG, D. *et al.* Manipulation of FASTQ data with Galaxy. **Bioinformatics**, v. 26, n. 14, p. 1783-5, 2010a.

BLANKENBERG, D. *et al.* Galaxy: a web-based genome analysis tool for experimentalists. **Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]**, v. Chapter 19, p. Unit 19 10 1-21, 2010b.

BLAUSTEIN, M. *et al.* Concerted regulation of nuclear and cytoplasmic activities of SR proteins by AKT. **Nature structural & molecular biology**, v. 12, n. 12, p. 1037-44, 2005.

BODE, W. *et al.* Structural properties of matrix metalloproteinases. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 55, n. 4, p. 639-52, 1999.

BOISE, L. H. *et al.* bcl-x, a bcl-2-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. **Cell**, v. 74, n. 4, p. 597-608, 1993.

BOONE, B. *et al.* EGFR in melanoma: clinical significance and potential therapeutic target. **J Cutan Pathol**, 2011.

BOYCE, S. T., HAM, R. G. Calcium-regulated differentiation of normal human epidermal keratinocytes in chemically defined clonal culture and serum-free serial culture. **The Journal of investigative dermatology**, v. 81, n. 1 Suppl, p. 33s-40s, 1983.

BRAUNSCHWEIG, U. *et al.* Dynamic Integration of Splicing within Gene Regulatory Pathways. **Cell**, v. 152, n. 6, p. 1252-1269, 2013.

BRESLOW, A. Thickness, cross-sectional areas and depth of invasion in the prognosis of cutaneous melanoma. **Annals of surgery**, v. 172, n. 5, p. 902-8, 1970.

BREW, K., DINAKARPANDIAN, D., NAGASE, H. Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1477, n. 1-2, p. 267-83, 2000.

BREW, K., NAGASE, H. The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): An ancient family with structural and functional diversity. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1803, n. 1, p. 55-71, 2010.



BROOKS, P. C. *et al.* Localization of matrix metalloproteinase MMP-2 to the surface of invasive cells by interaction with integrin alpha v beta 3. **Cell**, v. 85, n. 5, p. 683-93, 1996.

BUSTIN, S. A. *et al.* The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611-22, 2009.

BUTLER, G. S. *et al.* The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase "receptor" regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 2, p. 871-80, 1998.

CARTEGNI, L. *et al.* ESEfinder: A web resource to identify exonic splicing enhancers. **Nucleic acids research**, v. 31, n. 13, p. 3568-71, 2003.

CHAKRABORTI, S. *et al.* Regulation of matrix metalloproteinases: an overview. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 253, n. 1-2, p. 269-85, 2003.

CHANG, C. K., HUNG, W. C., CHANG, H. C. The Kazal motifs of RECK protein inhibit MMP-9 secretion and activity and reduce metastasis of lung cancer cells in vitro and in vivo. **J Cell Mol Med**, v. 12, n. 6B, p. 2781-9, 2008.

CHANG, H. C., CHO, C. Y., HUNG, W. C. Silencing of the metastasis suppressor RECK by RAS oncogene is mediated by DNA methyltransferase 3b-induced promoter methylation. **Cancer Res**, v. 66, n. 17, p. 8413-20, 2006.

CHANG, H. C., CHO, C. Y., HUNG, W. C. Downregulation of RECK by promoter methylation correlates with lymph node metastasis in non-small cell lung cancer. **Cancer Sci**, v. 98, n. 2, p. 169-73, 2007.

CHANG, H. C., LIU, L. T., HUNG, W. C. Involvement of histone deacetylation in ras-induced down-regulation of the metastasis suppressor RECK. **Cellular signalling**, v. 16, n. 6, p. 675-9, 2004.

CHANG, T. H. *et al.* An enhanced computational platform for investigating the roles of regulatory RNA and for identifying functional RNA motifs. **BMC bioinformatics**, v. 14 Suppl 2, p. S4, 2013.

CHIANG, C. H., HOU, M. F., HUNG, W. C. Up-regulation of miR-182 by beta-catenin in breast cancer increases tumorigenicity and invasiveness by targeting the matrix metalloproteinase inhibitor RECK. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1830, n. 4, p. 3067-76, 2013.

CHO, C. Y. *et al.* Epigenetic inactivation of the metastasis suppressor RECK enhances invasion of human colon cancer cells. **J Cell Physiol**, v. 213, n. 1, p. 65-9, 2007.

CLARK, W. H., JR. *et al.* A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. **Human pathology**, v. 15, n. 12, p. 1147-65, 1984.

COOPER, T. A., WAN, L., DREYFUSS, G. RNA and disease. **Cell**, v. 136, n. 4, p. 777-93, 2009.

CORREA, T. C. *et al.* Downregulation of the RECK-tumor and metastasis suppressor gene in glioma invasiveness. **J Cell Biochem**, v. 99, n. 1, p. 156-67, 2006.

CROWSON, A. N. *et al.* The molecular basis of melanomagenesis and the metastatic phenotype. **Seminars in Oncology**, v. 34, n. 6, p. 476-90, 2007.

CRUZ-MUNOZ, W. *et al.* Enhanced metastatic dissemination to multiple organs by melanoma and lymphoma cells in timp-3<sup>-/-</sup> mice. **Oncogene**, v. 25, n. 49, p. 6489-96, 2006.

CUI, R. *et al.* Central role of p53 in the suntan response and pathologic hyperpigmentation. **Cell**, v. 128, n. 5, p. 853-64, 2007.

CUMMINS, D. L. *et al.* Cutaneous malignant melanoma. **Mayo Clinic proceedings**, v. 81, n. 4, p. 500-7, 2006.

DANEN, E. H. *et al.* Emergence of alpha 5 beta 1 fibronectin- and alpha v beta 3 vitronectin-receptor expression in melanocytic tumour progression. **Histopathology**, v. 24, n. 3, p. 249-56, 1994.

DAS, S. *et al.* Oncogenic splicing factor SRSF1 is a critical transcriptional target of MYC. **Cell reports**, v. 1, n. 2, p. 110-7, 2012.

DAVID, C. J., MANLEY, J. L. Alternative pre-mRNA splicing regulation in cancer: pathways and programs unhinged. **Genes & development**, v. 24, n. 21, p. 2343-64, 2010.

DAVIES, H. *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. **Nature**, v. 417, n. 6892, p. 949-954, 2002.

DAVIES, M. A. The role of the PI3K-AKT pathway in melanoma. **Cancer journal**, v. 18, n. 2, p. 142-7, 2012.

DENNING, M. F. Specifying protein kinase C functions in melanoma. **Pigment cell & melanoma research**, v. 25, n. 4, p. 466-76, 2012.

DERYUGINA, E. I., QUIGLEY, J. P. Matrix metalloproteinases and tumor metastasis. **Cancer metastasis reviews**, v. 25, n. 1, p. 9-34, 2006.

DJERF, E. A. *et al.* ErbB receptor tyrosine kinases contribute to proliferation of malignant melanoma cells: inhibition by gefitinib (ZD1839). **Melanoma Res**, v. 19, n. 3, p. 156-66, 2009.

DONG, Q. *et al.* Expression of the reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs and matrix metalloproteinase-14 in neuroblastoma and the role in tumour

metastasis. **International journal of experimental pathology**, v. 91, n. 4, p. 368-73, 2010.

EGEBLAD, M., WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nature reviews. Cancer**, v. 2, n. 3, p. 161-74, 2002.

FERNANDEZ-FLORES, A. Prognostic factors for melanoma progression and metastasis: from Hematoxylin-Eosin to genetics. **Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie**, v. 53, n. 3, p. 449-59, 2012.

FIGUEIRA, R. C. *et al.* Correlation between MMPs and their inhibitors in breast cancer tumor tissue specimens and in cell lines with different metastatic potential. **BMC Cancer**, v. 9, p. 20, 2009.

FINGLETON, B. Matrix metalloproteinases: roles in cancer and metastasis. **Frontiers in bioscience : a journal and virtual library**, v. 11, p. 479-91, 2006.

FRANCISCO, G. *et al.* Melanoma Genetics: From Susceptibility to Progression. In: DUC, H. T. (Ed.). **Melanoma - From Early Detection to Treatment**: Intech, 2013.

FREEDMAN, V. H., SHIN, S. I. Cellular tumorigenicity in nude mice: correlation with cell growth in semi-solid medium. **Cell**, v. 3, n. 4, p. 355-9, 1974.

FURUMOTO, K. *et al.* RECK gene expression in hepatocellular carcinoma: correlation with invasion-related clinicopathological factors and its clinical significance. Reverse-inducing--cysteine-rich protein with Kazal motifs. **Hepatology**, v. 33, n. 1, p. 189-95, 2001.

GABRIELY, G. *et al.* MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. **Mol Cell Biol**, v. 28, n. 17, p. 5369-80, 2008.

GARIBYAN, L., FISHER, D. E. How sunlight causes melanoma. **Curr Oncol Rep**, v. 12, n. 5, p. 319-26, 2010.

GERMANN, S. *et al.* Splicing programs and cancer. **Journal of nucleic acids**, v. 2012, p. 269570, 2012.

GIBNEY, G. T. *et al.* Paradoxical oncogenesis--the long-term effects of BRAF inhibition in melanoma. **Nature reviews. Clinical oncology**, v. 10, n. 7, p. 390-9, 2013.

GOVINDARAJAN, B. *et al.* Overexpression of Akt converts radial growth melanoma to vertical growth melanoma. **The Journal of clinical investigation**, v. 117, n. 3, p. 719-29, 2007.

GRAVES, B. M. *et al.* Phosphoinositide-3-kinase/akt - dependent signaling is required for maintenance of [Ca(2+)](i), I(Ca), and Ca(2+) transients in HL-1 cardiomyocytes. **Journal of biomedical science**, v. 19, p. 59, 2012.

GRAY-SCHOPFER, V., WELLBROCK, C., MARAIS, R. Melanoma biology and new targeted therapy. **Nature**, v. 445, n. 7130, p. 851-7, 2007.

HAASS, N. K. *et al.* Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. **Pigment cell research / sponsored by the European Society for Pigment Cell Research and the International Pigment Cell Society**, v. 18, n. 3, p. 150-9, 2005.

HANAHAN, D., WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, 2000.

HATTA, M. *et al.* Density- and serum-dependent regulation of the Reck tumor suppressor in mouse embryo fibroblasts. **Cell Signal**, v. 21, n. 12, p. 1885-93, 2009.

HESLING, C. *et al.* In vivo and in situ modulation of the expression of genes involved in metastasis and angiogenesis in a patient treated with topical imiquimod for melanoma skin metastases. **The British journal of dermatology**, v. 150, n. 4, p. 761-7, 2004.

HIDAKA, H. *et al.* Tumor suppressive microRNA-1285 regulates novel molecular targets: aberrant expression and functional significance in renal cell carcinoma. **Oncotarget**, v. 3, n. 1, p. 44-57, 2012.

HILL, V. K. *et al.* Genome-wide DNA methylation profiling of CpG islands in breast cancer identifies novel genes associated with tumorigenicity. **Cancer research**, v. 71, n. 8, p. 2988-99, 2011.

HOFMANN, U. B., BECKER, J. C., BROCKER, E. B. [Role of matrix-degrading enzymes in melanoma progression]. **Hautarzt**, v. 53, n. 9, p. 587-95, 2002.

HOFMANN, U. B. *et al.* Stromal cells as the major source for matrix metalloproteinase-2 in cutaneous melanoma. **Arch Dermatol Res**, v. 297, n. 4, p. 154-60, 2005a.

HOFMANN, U. B. *et al.* Role of matrix metalloproteinases in melanoma cell invasion. **Biochimie**, v. 87, n. 3-4, p. 307-14, 2005b.

HOFMANN, U. B. *et al.* Matrix metalloproteinases in human melanoma. **J Invest Dermatol**, v. 115, n. 3, p. 337-44, 2000.

HOFMANN, U. B. *et al.* Matrix metalloproteinases in human melanoma cell lines and xenografts: increased expression of activated matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) correlates with melanoma progression. **Br J Cancer**, v. 81, n. 5, p. 774-82, 1999.

HONG, K. J. *et al.* The tumor suppressor RECK interferes with HER-2/Neu dimerization and attenuates its oncogenic signaling. **FEBS Lett**, 2011.

HSU, M. C., CHANG, H. C., HUNG, W. C. HER-2/neu represses the metastasis suppressor RECK via ERK and Sp transcription factors to promote cell invasion. **J Biol Chem**, v. 281, n. 8, p. 4718-25, 2006.

HSU, M. Y., ELDER, D., HERLYN, M. M. Melanoma: the Wistar Melanoma (WM) cell lines. In: MASTERS, J. R.; PALSSON, B. (Ed.). **Human cell Culture**. Netherlands: Springer, 2002. p. 259-274.

IIDA, J. *et al.* Membrane type-1 matrix metalloproteinase promotes human melanoma invasion and growth. **The Journal of investigative dermatology**, v. 122, n. 1, p. 167-76, 2004.

JACOMASSO, T. **Caracterização do Perfil de Expressão de MMPs e seus Inibidores, TIMPs e RECK, em Linhagens Representativas dos Diferentes Estágios de Progressão do Melanoma Humano**. Curitiba. 72 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2010.

JACOMASSO, T. *et al.* Downregulation of reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs in malignant melanoma: inverse correlation with membrane-type 1-matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase 2. **Melanoma research**, v. 24, n. 1, p. 32-9, 2014.

JOVINE, L. *et al.* The ZP domain is a conserved module for polymerization of extracellular proteins. **Nature cell biology**, v. 4, n. 6, p. 457-61, 2002.

KANG, H. G. *et al.* RECK expression in osteosarcoma: correlation with matrix metalloproteinases activation and tumor invasiveness. **J Orthop Res**, v. 25, n. 5, p. 696-702, 2007.

KARNI, R. *et al.* The gene encoding the splicing factor SF2/ASF is a proto-oncogene. **Nature structural & molecular biology**, v. 14, n. 3, p. 185-93, 2007.

KATO, K. *et al.* Effects of green tea polyphenol on methylation status of RECK gene and cancer cell invasion in oral squamous cell carcinoma cells. **Br J Cancer**, v. 99, n. 4, p. 647-54, 2008.

KENSKI, J. C. N. **Papel das Metaloproteinases de Matriz e seus Inibidores no Potencial Anti-Tumoral da Sinvastatina em Linhagens de Glioma Humano** Curitiba. 110 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

KITAJIMA, S. *et al.* Reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs interferes with epidermal growth factor receptor signaling. **Oncogene**, v. 30, n. 6, p. 737-50, 2011.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680-5, 1970.

LANDER, E. S. *et al.* Initial sequencing and analysis of the human genome. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 860-921, 2001.

LEE, K. J., LEE, K. Y., LEE, Y. M. Downregulation of a tumor suppressor RECK by hypoxia through recruitment of HDAC1 and HIF-1 $\alpha$  to reverse HRE site in the promoter. **Biochim Biophys Acta**, v. 1803, n. 5, p. 608-16, 2010.

LEE, Y. M. *et al.* Silencing of Reversion-Inducing Cysteine-Rich Protein with Kazal Motifs Stimulates Hyperplastic Phenotypes through Activation of Epidermal Growth Factor Receptor and Hypoxia-Inducible Factor-2 $\alpha$ . **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e84520, 2013.

LEIBOVITZ, A. The Growth and Maintenance of Tissue-Cell Cultures in Free Gas Exchange with the Atmosphere. **American journal of hygiene**, v. 78, p. 173-80, 1963.

LIN, H. Y., CHIANG, C. H., HUNG, W. C. STAT3 upregulates miR-92a to inhibit RECK expression and to promote invasiveness of lung cancer cells. **British journal of cancer**, v. 109, n. 3, p. 731-8, 2013.

LIU, L. T. *et al.* Induction of RECK by nonsteroidal anti-inflammatory drugs in lung cancer cells. **Oncogene**, v. 21, n. 54, p. 8347-50, 2002.

LIU, L. T. *et al.* Histone deacetylase inhibitor up-regulates RECK to inhibit MMP-2 activation and cancer cell invasion. **Cancer Res**, v. 63, n. 12, p. 3069-72, 2003.

LIU, S. *et al.* Identification of novel epigenetically modified genes in human melanoma via promoter methylation gene profiling. **Pigment Cell Melanoma Res**, v. 21, n. 5, p. 545-58, 2008a.

LIU, S. *et al.* Identification of novel epigenetically modified genes in human melanoma via promoter methylation gene profiling. **Pigment cell & melanoma research**, v. 21, n. 5, p. 545-58, 2008b.

LOAYZA-PUCH, F. *et al.* Hypoxia and RAS-signaling pathways converge on, and cooperatively downregulate, the RECK tumor-suppressor protein through microRNAs. **Oncogene**, v. 29, n. 18, p. 2638-48, 2010.

LONG, N. K. *et al.* Hypermethylation of the RECK gene predicts poor prognosis in oral squamous cell carcinomas. **Oral Oncol**, v. 44, n. 11, p. 1052-8, 2008.

MACDOUGALL, J. R. *et al.* The 92-kDa gelatinase B is expressed by advanced stage melanoma cells: suppression by somatic cell hybridization with early stage melanoma cells. **Cancer research**, v. 55, n. 18, p. 4174-81, 1995.

MIKI, T. *et al.* The  $\alpha$ 1-integrin-dependent function of RECK in physiologic and tumor angiogenesis. **Mol Cancer Res**, v. 8, n. 5, p. 665-76, 2010.

MIKI, T. *et al.* The reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) interacts with membrane type 1 matrix metalloproteinase and CD13/aminopeptidase N and modulates their endocytic pathways. **J Biol Chem**, v. 282, n. 16, p. 12341-52, 2007.

MILLER, A. J., MIHM, M. C., JR. Melanoma. **The New England journal of medicine**, v. 355, n. 1, p. 51-65, 2006.

MOOI, W. J., PEEPER, D. S. Oncogene-induced cell senescence--halting on the road to cancer. **The New England journal of medicine**, v. 355, n. 10, p. 1037-46, 2006.

MORIOKA, Y. *et al.* The membrane-anchored metalloproteinase regulator RECK stabilizes focal adhesions and anterior-posterior polarity in fibroblasts. **Oncogene**, v. 28, n. 11, p. 1454-64, 2009.

MURPHY, G. Tissue inhibitors of metalloproteinases. **Genome biology**, v. 12, n. 11, p. 233, 2011.

NAGASE, H., VISSE, R., MURPHY, G. Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. **Cardiovascular research**, v. 69, n. 3, p. 562-73, 2006.

NAGINI, S. RECKing MMP: Relevance of Reversion-inducing Cysteine-rich Protein with Kazal Motifs as a Prognostic Marker and Therapeutic Target for Cancer (A Review). **Anti-cancer agents in medicinal chemistry**, 2012.

NAKAHARA, H. *et al.* Transmembrane/cytoplasmic domain-mediated membrane type 1-matrix metalloprotease docking to invadopodia is required for cell invasion. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 15, p. 7959-64, 1997.

NODA, M. *et al.* RECK: a novel suppressor of malignancy linking oncogenic signaling to extracellular matrix remodeling. **Cancer Metastasis Rev**, v. 22, n. 2-3, p. 167-75, 2003.

NODA, M., TAKAHASHI, C. Recklessness as a hallmark of aggressive cancer. **Cancer Sci**, v. 98, n. 11, p. 1659-65, 2007.

OH, J. *et al.* The membrane-anchored MMP inhibitor RECK is a key regulator of extracellular matrix integrity and angiogenesis. **Cell**, v. 107, n. 6, p. 789-800, 2001.

OHL, F. *et al.* Gene expression studies in prostate cancer tissue: which reference gene should be selected for normalization? **Journal of molecular medicine**, v. 83, n. 12, p. 1014-24, 2005.

OMURA, A. *et al.* RECK forms cowbell-shaped dimers and inhibits matrix metalloproteinase-catalyzed cleavage of fibronectin. **J Biol Chem**, v. 284, n. 6, p. 3461-9, 2009.

OSHIMA, T. *et al.* Clinicopathological significance of the gene expression of matrix metalloproteinases and reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs in patients with colorectal cancer: MMP-2 gene expression is a useful predictor of liver metastasis from colorectal cancer. **Oncol Rep**, v. 19, n. 5, p. 1285-91, 2008.

OTHMAN, N. *et al.* Bcl-xL Silencing Induces Alterations in hsa-miR-608 Expression and Subsequent Cell Death in A549 and SK-LU1 Human Lung Adenocarcinoma Cells. **PLoS One**, v. 8, n. 12, p. e81735, 2013.

PAN, Q. *et al.* Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. **Nat Genet**, v. 40, n. 12, p. 1413-1415, 2008.

PARAISO, K. H. *et al.* PTEN loss confers BRAF inhibitor resistance to melanoma cells through the suppression of BIM expression. **Cancer research**, v. 71, n. 7, p. 2750-60, 2011.

PESTA, M. *et al.* Significance of methylation status and the expression of RECK mRNA in lung tissue of patients with NSCLC. **Anticancer Res**, v. 29, n. 11, p. 4535-9, 2009.

PETITCLERC, E. *et al.* Integrin alpha(v)beta3 promotes M21 melanoma growth in human skin by regulating tumor cell survival. **Cancer research**, v. 59, n. 11, p. 2724-30, 1999.

PLOCIK, ALEX M., GRAVELEY, BRENTON R. New Insights from Existing Sequence Data: Generating Breakthroughs without a Pipette. **Molecular cell**, v. 49, n. 4, p. 605-617, 2013.

QI, J. H. *et al.* A novel function for tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP3): inhibition of angiogenesis by blockage of VEGF binding to VEGF receptor-2. **Nature medicine**, v. 9, n. 4, p. 407-15, 2003.

QIN, J., LUO, M. MicroRNA-221 promotes colorectal cancer cell invasion and metastasis by targeting RECK. **FEBS letters**, v. 588, n. 1, p. 99-104, 2014.

REED, K. B. *et al.* Increasing incidence of melanoma among young adults: an epidemiological study in Olmsted County, Minnesota. **Mayo Clinic proceedings**, v. 87, n. 4, p. 328-34, 2012.

REGAD, T. Molecular and cellular pathogenesis of melanoma initiation and progression. **Cellular and molecular life sciences : CMLS**, v. 70, n. 21, p. 4055-65, 2013.

ROBINSON, C. J., STRINGER, S. E. The splice variants of vascular endothelial growth factor (VEGF) and their receptors. **J Cell Sci**, v. 114, n. Pt 5, p. 853-65, 2001.

RUSKIN, B. *et al.* Excision of an intact intron as a novel lariat structure during pre-mRNA splicing in vitro. **Cell**, v. 38, n. 1, p. 317-31, 1984.

SAEED, A. I. *et al.* TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. **BioTechniques**, v. 34, n. 2, p. 374-8, 2003.

SALTZMAN, A. L., PAN, Q., BLENCOWE, B. J. Regulation of alternative splicing by the core spliceosomal machinery. **Genes & development**, v. 25, n. 4, p. 373-84, 2011.



SASAHARA, R. M. *et al.* Transcriptional control of the RECK metastasis/angiogenesis suppressor gene. **Cancer Detect Prev**, v. 26, n. 6, p. 435-43, 2002.

SASAHARA, R. M., TAKAHASHI, C., NODA, M. Involvement of the Sp1 site in ras-mediated downregulation of the RECK metastasis suppressor gene. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 264, n. 3, p. 668-75, 1999a.

SASAHARA, R. M. *et al.* Oncogene-mediated downregulation of RECK, a novel transformation suppressor gene. **Braz J Med Biol Res**, v. 32, n. 7, p. 891-5, 1999b.

SATYAMOORTHY, K. *et al.* Melanoma cell lines from different stages of progression and their biological and molecular analyses. **Melanoma research**, v. 7 Suppl 2, p. S35-42, 1997.

SCHRAMM, S. J. *et al.* Review and cross-validation of gene expression signatures and melanoma prognosis. **The Journal of investigative dermatology**, v. 132, n. 2, p. 274-83, 2012.

SCHWERK, C., SCHULZE-OSTHOFF, K. Regulation of apoptosis by alternative pre-mRNA splicing. **Molecular cell**, v. 19, n. 1, p. 1-13, 2005.

SEFTOR, R. E. *et al.* The 72 kDa type IV collagenase is modulated via differential expression of alpha v beta 3 and alpha 5 beta 1 integrins during human melanoma cell invasion. **Cancer research**, v. 53, n. 14, p. 3411-5, 1993.

SEO, D. W. *et al.* Shp-1 mediates the antiproliferative activity of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 in human microvascular endothelial cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 281, n. 6, p. 3711-21, 2006.

SHARPLESS, E., CHIN, L. The INK4a/ARF locus and melanoma. **Oncogene**, v. 22, n. 20, p. 3092-8, 2003.

SHAW, R. J., CANTLEY, L. C. Ras, PI(3)K and mTOR signalling controls tumour cell growth. **Nature**, v. 441, n. 7092, p. 424-430, 2006.

SILVEIRA CORREA, T. C. *et al.* RECK-mediated inhibition of glioma migration and invasion. **J Cell Biochem**, v. 110, n. 1, p. 52-61, 2010.

SMALLEY, K. S. *et al.* Multiple signaling pathways must be targeted to overcome drug resistance in cell lines derived from melanoma metastases. **Mol Cancer Ther**, v. 5, n. 5, p. 1136-44, 2006.

SMITH, P. J. *et al.* An increased specificity score matrix for the prediction of SF2/ASF-specific exonic splicing enhancers. **Human molecular genetics**, v. 15, n. 16, p. 2490-508, 2006.

SOLUS, J. F., KRAFT, S. Ras, Raf, and MAP kinase in melanoma. **Advances in anatomic pathology**, v. 20, n. 4, p. 217-26, 2013.

SONG, S. Y. *et al.* Expression of reversion-inducing-cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) as a prognostic indicator in gastric cancer. **Eur J Cancer**, v. 42, n. 1, p. 101-8, 2006.

SPAN, P. N. *et al.* Matrix metalloproteinase inhibitor reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs: a prognostic marker for good clinical outcome in human breast carcinoma. **Cancer**, v. 97, n. 11, p. 2710-5, 2003.

SPRINGMAN, E. B. *et al.* Multiple modes of activation of latent human fibroblast collagenase: evidence for the role of a Cys73 active-site zinc complex in latency and a "cysteine switch" mechanism for activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 87, n. 1, p. 364-8, 1990.

STAHL, J. M. *et al.* Deregulated Akt3 activity promotes development of malignant melanoma. **Cancer research**, v. 64, n. 19, p. 7002-10, 2004.

STAMENKOVIC, I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. **The Journal of pathology**, v. 200, n. 4, p. 448-64, 2003.

STETLER-STEVENSON, W. G. The tumor microenvironment: regulation by MMP-independent effects of tissue inhibitor of metalloproteinases-2. **Cancer metastasis reviews**, v. 27, n. 1, p. 57-66, 2008.

STRONGIN, A. Y. *et al.* Mechanism of cell surface activation of 72-kDa type IV collagenase. Isolation of the activated form of the membrane metalloprotease. **The Journal of biological chemistry**, v. 270, n. 10, p. 5331-8, 1995.

TAKAGI, S., SIMIZU, S., OSADA, H. RECK negatively regulates matrix metalloproteinase-9 transcription. **Cancer Res**, v. 69, n. 4, p. 1502-8, 2009.

TAKAHASHI, C. *et al.* Regulation of matrix metalloproteinase-9 and inhibition of tumor invasion by the membrane-anchored glycoprotein RECK. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 22, p. 13221-6, 1998.

TAKEMOTO, N. *et al.* Low expression of reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) indicates a shorter survival after resection in patients with adenocarcinoma of the lung. **Lung Cancer**, v. 58, n. 3, p. 376-83, 2007.

TAKENAKA, K. *et al.* Expression of a novel matrix metalloproteinase regulator, RECK, and its clinical significance in resected non-small cell lung cancer. **Eur J Cancer**, v. 40, n. 10, p. 1617-23, 2004.

TAKEUCHI, T. *et al.* The membrane-anchored matrix metalloproteinase (MMP) regulator RECK in combination with MMP-9 serves as an informative prognostic indicator for colorectal cancer. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 16, p. 5572-9, 2004.

TALANTOV, D. *et al.* Novel genes associated with malignant melanoma but not benign melanocytic lesions. **Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research**, v. 11, n. 20, p. 7234-42, 2005.

TOWBIN, H., STAEBELIN, T., GORDON, J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 76, n. 9, p. 4350-4, 1979.

TRAPNELL, C., PACHTER, L., SALZBERG, S. L. TopHat: discovering splice junctions with RNA-Seq. **Bioinformatics**, v. 25, n. 9, p. 1105-11, 2009.

TRAPNELL, C. *et al.* Transcript assembly and quantification by RNA-Seq reveals unannotated transcripts and isoform switching during cell differentiation. **Nat Biotech**, v. 28, n. 5, p. 511-515, 2010.

TROMBETTA-LIMA, M. *et al.* Divergent Roles for Tumor Suppressor Genes in Cancer. In: GUNDUZ, M.; GUNDUZ, E. (Ed.). **Tumor Suppressor Genes**. Hauppauge: Nova Publishers, 2013. Cap.16. p. 387-420.

VAN DEN STEEN, P. E. *et al.* Biochemistry and molecular biology of gelatinase B or matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). **Critical reviews in biochemistry and molecular biology**, v. 37, n. 6, p. 375-536, 2002.

VAN DER JAGT, M. F. *et al.* Correlation of reversion-inducing cysteine-rich protein with kazal motifs (RECK) and extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN), with MMP-2, MMP-9, and survival in colorectal cancer. **Cancer Lett**, v. 237, n. 2, p. 289-97, 2006.

VANDESOMPELE, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. **Genome biology**, v. 3, n. 7, p. RESEARCH0034, 2002.

VARMA, R., MAYOR, S. GPI-anchored proteins are organized in submicron domains at the cell surface. **Nature**, v. 394, n. 6695, p. 798-801, 1998.

VIDWANS, S. J. *et al.* A Melanoma Molecular Disease Model. **PLoS One**, v. 6, n. 3, p. e18257, 2011.

VU, T. H., WERB, Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. **Genes Dev**, v. 14, n. 17, p. 2123-33, 2000.

WAN, P. T. *et al.* Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. **Cell**, v. 116, n. 6, p. 855-67, 2004.

WANG, E. T. *et al.* Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. **Nature**, v. 456, n. 7221, p. 470-476, 2008.

WANG, N. *et al.* MiR-21 down-regulation suppresses cell growth, invasion and induces cell apoptosis by targeting FASL, TIMP3, and RECK genes in esophageal carcinoma. **Digestive diseases and sciences**, v. 58, n. 7, p. 1863-70, 2013.

WANG, Z., BURGE, C. B. Splicing regulation: From a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. **RNA**, v. 14, n. 5, p. 802-813, 2008.

WEG-REMERS, S. *et al.* Regulation of alternative pre-mRNA splicing by the ERK MAP-kinase pathway. **The EMBO journal**, v. 20, n. 15, p. 4194-203, 2001.

WU, H., GOEL, V., HALUSKA, F. G. PTEN signaling pathways in melanoma. **Oncogene**, v. 22, n. 20, p. 3113-22, 2003.

XIN, C. *et al.* MicroRNA-15a promotes neuroblastoma migration by targeting reversion-inducing cysteine-rich protein with Kazal motifs (RECK) and regulating matrix metalloproteinase-9 expression. **The FEBS journal**, v. 280, n. 3, p. 855-66, 2013.

XU, L. *et al.* Gene expression changes in an animal melanoma model correlate with aggressiveness of human melanoma metastases. **Molecular cancer research : MCR**, v. 6, n. 5, p. 760-9, 2008.

YAMAMOTO, M. *et al.* The transformation suppressor gene Reck is required for postaxial patterning in mouse forelimbs. **Biology open**, v. 1, n. 5, p. 458-66, 2012.

YEA, S. *et al.* Ras promotes growth by alternative splicing-mediated inactivation of the KLF6 tumor suppressor in hepatocellular carcinoma. **Gastroenterology**, v. 134, n. 5, p. 1521-31, 2008.

YOON, S. O. *et al.* Roles of matrix metalloproteinases in tumor metastasis and angiogenesis. **J Biochem Mol Biol**, v. 36, n. 1, p. 128-37, 2003.

YOSHIDA, Y. *et al.* Involvement of the SKP2-p27KIP1 pathway in suppression of cancer cell proliferation by RECK. **Oncogene**, 2011.

YOSHINO, Y. *et al.* Clinical relevance of serum levels of matrix metalloproteinase-2, and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 and -2 in patients with malignant melanoma. **The Journal of dermatology**, v. 35, n. 4, p. 206-14, 2008.

ZAIDI, M. R., DAY, C. P., MERLINO, G. From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse. **The Journal of investigative dermatology**, v. 128, n. 10, p. 2381-91, 2008.

ZHANG, J. *et al.* miR-96 promotes tumor proliferation and invasion by targeting RECK in breast cancer. **Oncology reports**, 2013.

ZHAO, H. *et al.* MiR-25 promotes gastric cancer cells growth and motility by targeting RECK. **Molecular and cellular biochemistry**, v. 385, n. 1-2, p. 207-13, 2014.

ZHOU, Z., FU, X. D. Regulation of splicing by SR proteins and SR protein-specific kinases. **Chromosoma**, v. 122, n. 3, p. 191-207, 2013.

## APÊNDICE

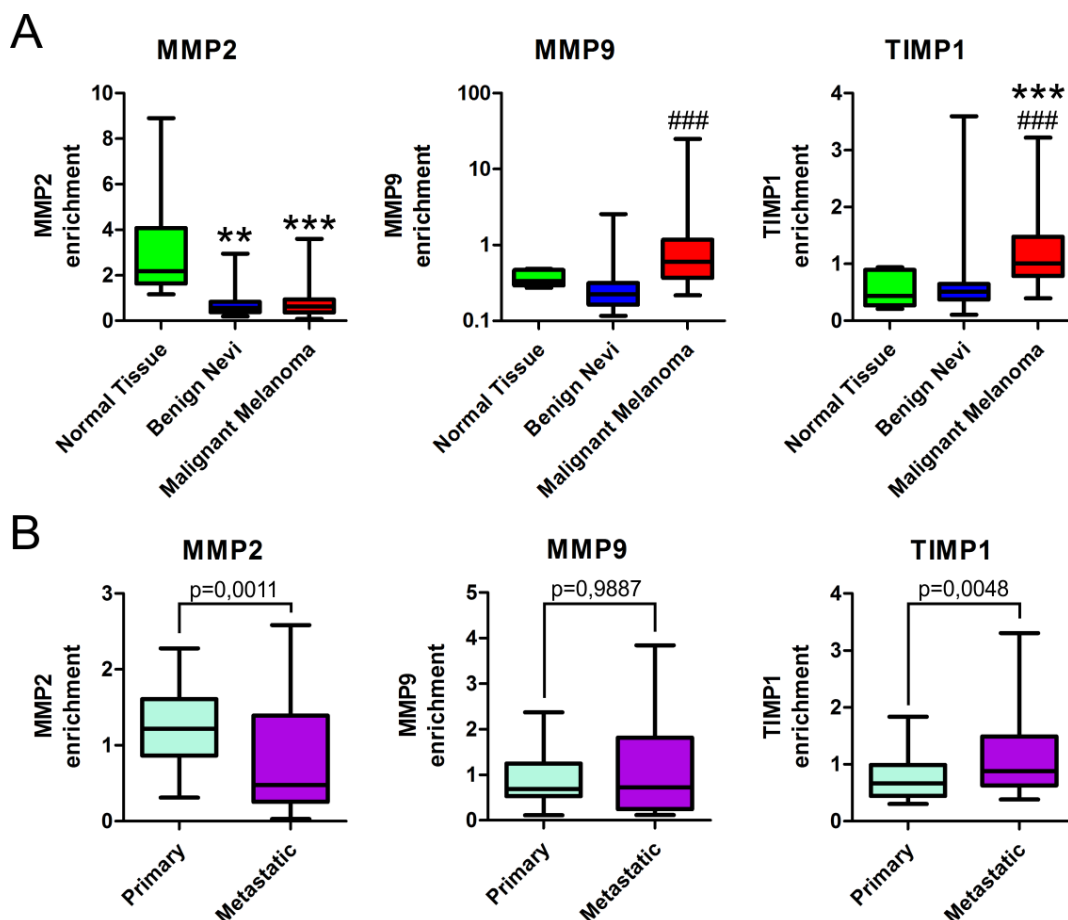


FIGURA 39 – EXPRESSÃO DE *MMP2*, *MMP9* E *TIMP1* EM AMOSTRAS CLÍNICAS DE DIFERENTES ESTÁGIOS DA PROGRESSÃO

FONTE: O Autor

NOTA: Os gráficos representam as distribuições dos valores de expressão normalizados para cada grupo de amostras. As caixas indicam o intervalo entre o segundo e o terceiro quartil (25º e 75º percentis), e as barras indicam os valores máximos e mínimos de cada grupo. As linhas dentro das caixas representam os valores medianos de expressão. A, expressão no painel de amostras reunido por Talantov *et al.* (2005). As medianas foram comparadas utilizando o teste de Kruskal-Wallis (ANOVA não-paramétrico). \*\*\*,  $p<0,001$  em relação aos tecidos normais. ###,  $p<0,001$  em relação aos *nevi* benignos. \*\*\*,  $p<0,001$  em relação à tecidos normais. B, expressão no painel de amostras reunido por Talantov *et al.* (2005). As medianas foram comparadas e os valores de  $p$  calculados utilizando o teste  $t$  não paramétrico de Mann Whitney. São consideradas significativas as diferenças com valores de  $p<0,05$ .

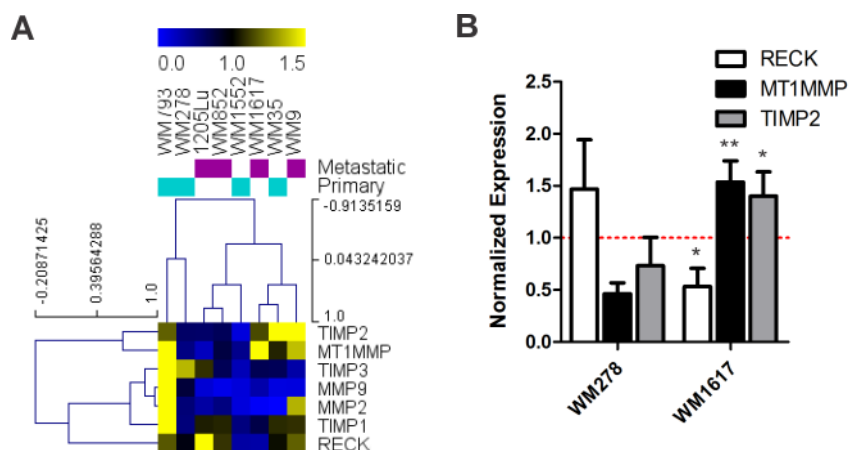


FIGURA 40 – EXPRESSÃO E CORRELAÇÃO ENTRE MMPs E INIBIDORES EM LINHAGENS DE MELANOMA HUMANO

FONTE: O Autor

NOTA: A, A expressão de MMPs e seus inibidores foi quantificada em linhagens de melanoma humano derivadas de lesões primárias (azul claro) ou de metástases (violeta), através de RT-qPCR, e os valores obtidos foram utilizados para a análise de *hierarchical clustering*. B, Expressão de RECK, MT1MMP e TIMP2 em um par de linhagens de melanoma primário (WM278) e metastático (WM1617) obtidas do mesmo paciente. Para cada gene, os valores de expressão foram divididos pela média de expressão deste gene nas duas linhagens. A linha vermelha representa esta média.